



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

“Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής και περιβάλλοντος”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΑΠΟ ΥΓΡΑ
ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ.**



ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Δ. ΓΕΡΑΣΟΠΟΥΛΟΣ.
Αξιωματικός Πολεμικής Αεροπορίας (Ε.Α.).
Τεχνολόγος Γεωπόνος.

Λάρισα 2012.

***ISOLATION – PROCESSING OF POLYPHENOLIC SUBSTANCES
FROM OLIVE MILL WASTE-WATERS (OMWW) AND ASSESSMENT
OF THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY.***

***ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ
ΑΠΟ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ
ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ.***

© 2012 ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΕΡΑΣΟΠΟΥΛΟΣ.

Η έγκριση της μεταπτυχιακής εργασίας, από το Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα. (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κων/νος Πετρωτός: Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας.

Στην Οικογένειά μου.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτρη Κουρέτα, εκπονήθηκε στα εργαστήρια: α).Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και β). Μηχανικής τροφίμων και Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, όπως επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές του, την υπομονή του και την κατανόησή του. Ευχαριστώ επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή του ΤΕΙ/Λάρισας κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό, για δύο πράγματα. Πρώτον, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο άτομό μου και με προέτρεψε στην παρακολούθηση του μεταπτυχιακού προγράμματος και δεύτερον για την πλήρη υποστήριξη, την παροχή οδηγιών και την διάθεση των μέσων του εργαστηρίου της Μηχανικής Τροφίμων. Ευχαριστώ τον Λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο, για την συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για το συνεργατικό και ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη σύζυγό μου Δήμητρα για τη στήριξη και βοήθεια που μου προσέφερε καθώς και τους συναδέλφους μου και πολύ καλούς φίλους Τάσο Μπέσιο, Ανδρομάχη Μπόκαρη και Αλέξανδρο Ντόντο, για τη συνεργασία τους, τόσο στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, όσο και κατά τη διάρκεια της φοίτησης στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.

Εδώ και μερικά χρόνια, έχει σημειωθεί κυριολεκτικά μία έκρηξη στην παραγωγή διατροφικών προϊόντων φυτικής προέλευσης. Η αιτία είναι το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο, στο οποίο αποδίδεται βάσει μελετών, μεγάλης έκτασης βιοδραστικότητα. Είναι αξιοσημείωτο πως στην τελευταία δεκαετία, ο αριθμός των μελετών που αφορά στην βιοδραστικότητα του ελαιολάδου και των αποβλήτων της επεξεργασίας του, φθάνει πάνω από 700. Αυτό σημαίνει πως το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας είναι πολύ μεγάλο, όσον αφορά στο πολυφαινολικό προφίλ του ελαιολάδου και των αποβλήτων του, στο οποίο αποδίδονται σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες που πιθανόν να σχετίζονται στην πρόληψη ασθενειών.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση – επεξεργασία πολυφαινολικών συστατικών σε μορφή υγρού εκχυλίσματος και σκόνης, υψηλής προστιθέμενης αξίας, από τα απόβλητα ελαιотριβείου, καθώς ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής τους δράσης, έτσι ώστε, με την κατάλληλη προσθήκη αυτών σε ποτό, τρόφιμο ή φάρμακο, να προσδίδονται οι θετικές ιδιότητες του ελαιολάδου.

Για την απομόνωση των πολυφαινολών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που αναφέρεται στην παρούσα εργασία και περιλαμβάνει τα στάδια: ραφινάρισμα, μικροδιήθηση, συμπύκνωση με αντίστροφη οσμωση, κατακρατηση πολυφαινολών από ρητίνη, παραλαβή πολυφαινολών από ρητίνη, συμπύκνωση με αντίστροφη οσμωση και τελικά, συμπύκνωση με αντλία κενού. Για την επεξεργασία των πολυφαινολικών συστατικών σε μορφή υγρού εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν: πειραματικός δακτύλιος, με μεμβράνες 2.000 και 8.000 Da. και συσκευή ακίδας υπερήχων. Για την επεξεργασία σε μορφή σκόνης, εκτελέστηκε ενθυλάκωση του πολυφαινολικού υγρού με την χρήση συσκευών Spray Dryer και Freeze Dryer.

Ακολούθως, εκτελέστηκε μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων που ελήφθησαν από τα στάδια της απομόνωσης και της επεξεργασίας, με τις μεθόδους DPPH και ABTS. Τα αποτελέσματα μαρτυρούν, τόσο για το υγρό εκχύλισμα, όσο και για την σκόνη, αντιοξειδωτική δράση.

Επομένως, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα, το υγρό αντιοξειδωτικό, αλλά και η ενθυλάκωση αυτού, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν από την βιομηχανία, για ενίσχυση – βελτίωση των προϊόντων διατροφής και των φαρμακευτικών σκευασμάτων, έτσι ώστε, με την κατάλληλη προσθήκη αυτών σε ποτό, τρόφιμο ή φαρμακευτικό σκεύασμα, να προσδίδονται οι θετικές ιδιότητες του ελαιολάδου.

ABSTRACT.

For several years, there has been in the strict sense, a sudden increase in generation of plant origin food products. The reason why, is their polyphenolic content, which is attributed by studies, large-scale bioactivity. It is remarkable, the last decade, that the number of studies, only for olive oil and for olive mill waste waters (OMWW), as far the bioactivity is concerning is over 700. This means that the interest on the polyphenolic profile of olive oil and its OMWW, of the scientific community is much increased. That is, because the polyphenols provide significant antioxidant properties, which may be related to disease prevention.

The objectives of this work were: first, the isolation - processing of polyphenolic substances, from OMWW in liquid extract form and powder, with high added value, and second, to control their antioxidant activity, in order with proper insertion of these substances into food, drink or drug, the final product has to obtain the beneficial properties of olive oil.

In order to isolate the most of polyphenolic compound, the used method that is referring to the present work, includes the following stages: refining, microfiltration, condensation by reverse osmosis, retention of polyphenols from resin, polyphenols reception from resin, condensation by reverse osmosis and condensation with a vacuum evaporator. For the liquid extract processing, an experimental closed circuit was used, including membranes (2.000 and 8.000 Da.). An ultrasonic liquid processor was used for emulsion (1/100 micron). For the powder processing, polyphenolic liquid encapsulation was executed, using spray drying and freeze drying technology. Following that, antioxidant activity of the polyphenolic product was executed with two(2) in vitro methods, based on the neutralization of stable chemical radicals DPPH[•] and ABTS^{•+}. The results showed antioxidant activity, both for the liquid extract and the powder product.

Consequently, based on the results, the liquid and the powder product, can be used by the industry for support - improve food and pharmaceutical products, so that with the appropriate addition to drink, food or drug, to impart the beneficial properties of olive oil.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	9
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	14
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	16
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	18
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	20
1.1. Η Παραγωγή Ελαιολάδου και τα Απόβλητά της.....	22
1.1.1. Η καλλιέργεια της ελιάς.....	22
1.1.2. Στατιστικά Στοιχεία F.A.O. (<i>Food and Agriculture Organization</i>).....	24
1.1.3. Είδη, Ποιοτικά Χαρακτηριστικά & Κριτήρια Αξιολόγησης του Ελαιολάδου.....	25
1.1.3.1 Επίσημες Ποιοτικές Κατηγορίες Ελαιολάδου.....	26
1.1.4. Πως Καθορίζεται η Ποιότητα του Ελαιολάδου.....	27
1.1.4.1. Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά του Ελαιολάδου.....	28
1.1.5. Απόβλητα Ελαιουργείων.....	29
1.1.6. Η Ισχύουσα Ελληνική Νομοθεσία για τα Ελαιотριβεία.....	30
1.2. Η Σύσταση των Αποβλήτων του Ελαιотριβείου.....	33
1.3. Μέθοδοι Επεξεργασίας και Χρήσεις Αποβλήτων Παραγωγής Ελαιολάδου.....	36
1.3.1. Ιστορικό.....	36
1.3.2. Μέθοδοι Επεξεργασίας και Διάθεσης του Κασίγαρου. (Γενικά).....	37
1.3.3. Μέθοδοι διαχείρισης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων.(ΥΑΕ).....	39
1.3.3.1. Μηχανική επεξεργασία.....	40
1.3.3.2. Βιολογική επεξεργασία.....	42
1.3.3.3. Φυσικοχημική επεξεργασία.....	46
1.4. Το Φαινολικό Περιεχόμενο των Αποβλήτων του Ελαιотριβείου.....	51
1.4.1. Πολυφαινόλες.....	51
1.4.1.1. Ορισμός.....	51
1.4.1.2. Ονοματολογία.....	51
1.4.1.3. Φυσικές Ιδιότητες.....	52

1.4.1.4.	Οξύτητα.....	52
1.4.2.	Φυτικές Πολυφαινόλες – Κατηγορίες.....	53
1.4.3.	Όρος WBSSH.....	54
1.4.4.	Πολυφαινόλες στα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου.....	55
1.5.	Μέθοδοι Εξαγωγής των Φαινολικών Ενώσεων.....	60
1.5.1.	Γενικά.....	60
1.5.2.	Εκχύλιση Υγρού – Υγρού.....	60
1.5.3.	Εκχύλιση Στερεού – Υγρού.....	60
1.5.4.	Υπερκρίσιμη Εκχύλιση Ρευστού (SFE - Supercritical Fluid Extraction).....	62
1.6.	Βιοδραστικότητα Πολυφαινολών από Απόβλητα Ελαιοτριβείου.....	63
1.6.1.	Γενικά.....	63
1.6.2.	Οξειδωτικό Στρες.....	64
1.6.2.1.	Ιστορική Αναδρομή.....	64
1.6.2.2.	Ελευθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O ₂	65
1.6.2.3.	Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας.....	66
1.6.2.4.	Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας.....	68
1.6.3.	Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.....	70
1.6.4.	Πολυφαινόλες από Απόβλητα Ελαιοτριβείου – Βιοδραστικότητα....	74
1.6.4.1.	Βιοδραστικότητα – Γενικά.....	74
1.6.4.2.	Καρδιαγγειακό.....	75
1.6.4.3.	Αντιμικροβιακή και Αντι-ϊική Δραστηριότητα.....	82
1.6.4.4.	Καρκίνος.....	85
1.7.	Σκοπός.....	86
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	87
2.1.	Γενικά.....	87
2.2.	Ιστορικό.....	87
2.3.	Επεξεργασία Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου.....	88
2.4.	Κωδικοποίηση Σταδίων Επεξεργασίας Υ.Α.Ε.....	89
2.5.	Μέθοδοι Εκτίμησης της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας των Πολυφαινολών από Απόβλητα Ελαιοτριβείου.....	90
2.5.1.	Γενικά.....	90

2.5.2.	Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH'	90
2.5.2.1.	Αρχή της Μεθόδου.....	90
2.5.2.2.	Πειραματική Διαδικασία.....	91
2.5.2.3.	Υπολογισμός της Αντιοξ/κής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.....	92
2.5.3.	Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS^{•+}	93
2.5.3.1.	Αρχή της Μεθόδου.....	93
2.5.3.2.	Πειραματική Διαδικασία.....	94
2.5.3.3.	Υπολογισμός της Αντιοξ/κής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.....	96
2.6.	Δείγματοληψία Επεξεργασμένων Υ.Α.Ε.....	97
2.7.	Συσκευή Ακίδας Υπερήχων.....	98
2.7.1.	Αρχή Λειτουργίας.....	98
2.7.2.	Διακοπτολογία Συσκευής Υπερήχων.....	99
2.8.	Υπερδιήθηση σε Πειραματικό Δακτύλιο, με την Χρήση. Μεμβρανών 2.000 και 8.000 Dalton.	99
2.8.1.	Πειραματικός Δακτύλιος.....	99
2.8.2.	Υλικά και Μέσα.....	100
2.8.3.	Πειραματική Διαδικασία.....	101
2.8.3.1.	Με μεμβράνες 2.000 Da.....	101
2.8.3.2.	Με μεμβράνες 8.000 Da.....	101
2.9.	Ξήρανση - Ενθυλάκωση με Ψεκασμό. - Spray Drying.....	102
2.9.1.	Γενικά.....	102
2.9.2.	Αρχή Λειτουργίας.....	102
2.9.3.	Τεχνικά Χαρακτηριστικά του Mini Spray Dryer B-290.....	104
2.9.4.	Επεξεργασία Υγρών Διαλυμάτων στο Spray Dryer.....	105
2.10.	Κρυοξήρανση – Ενθυλάκωση με Freeze Drying.....	106
2.10.1.	Γενικά.....	106
2.10.2.	Αρχή Λειτουργίας.....	107
2.11.	Μέτρηση Αντιοξειδωτικής Δράσης σε Όξινο pH, Σκόνης που Προήλθε από το Spray Dryer.....	108

3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	109
3.1.	Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας των Επεξεργασμένων Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου, μέσω της Αλληλεπίδρασης με τις Ρίζες DPPH• και ABTS ^{•+}	109
3.2.	Στοιχεία Χημικής Ανάλυσης του Υγρού Αντιοξειδωτικού (24 Brix)...	113
3.2.1.	Γενικά.....	113
3.2.2.	Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά.....	113
3.2.3.	Χημική Σύνθεση.....	113
3.2.4.	HPLC Πολυφαινολικό Προφίλ του Προϊόντος.....	113
3.3.	Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας των Επεξεργασμένων Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου με την Συσκευή Ακίδας Υπερήχων, μέσω της Αλληλεπίδρασης με τις Ρίζες DPPH• και ABTS ^{•+}	115
3.3.1.	Γενικά.....	115
3.3.2.	Αποτελέσματα Μετρήσεων.....	115
3.4.	Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας, Κατακρατήματος και Διηθήματος, που προήλθαν από τον Πειραματικό Δακτύλιο, μέσω της Αλληλεπίδρασης με τις Ρίζες DPPH• και ABTS ^{•+}	117
3.4.1.	Γενικά.....	117
3.4.2.	Με Μembrάνη Οξικής Κυτταρίνης (2.000 Da.).....	117
3.4.3.	Με Μembrάνη Πολυσουλφόνης (8.000 Da.).....	118
3.5.	Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας, Ενθυλακωμένης Πολυφαινολικής Σκόνης, που Προήλθε από το Spray Dryer, μέσω της Αλληλεπίδρασης με τις Ρίζες DPPH• και ABTS ^{•+}	119
3.5.1.	Γενικά.....	119
3.5.2.	Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα.....	120
3.6.	Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας, Ενθυλακωμένης Σκόνης, που Προήλθε από το Spray Dryer (Δ1), μέσω της Αλληλεπίδρασης με την Ρίζα DPPH•, σε Όξινο pH.....	122
3.6.1.	Γενικά.....	122
3.6.2.	Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα.....	122
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	123
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	127

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.

Πίνακας 1.	Σύσταση των Αποβλήτων των Ελαιοτριβείων.	34
Πίνακας 2.	Μέθοδοι Διαχείρισης των Υγρών Αποβλήτων Ελαιοουργείων.	39
Πίνακας 3.	Συστατικά Απόρριψης.	49
Πίνακας 4.	Φυτικές Πολυφαινόλες.	54
Πίνακας 5.	Συγκεντρώσεις Φαινολικών Συστατικών του Κασιίγαρου.	59
Πίνακας 6.	Συγκριτικές Τιμές, με την Μέθοδο O.R.A.C. (in vitro only).	59
Πίνακας 7.	Οργανικοί Διαλύτες που Χρησιμοποιούνται για την Εξαγωγή των Πολυφαινολών.	61
Πίνακας 8.	Ενδογενή Αντιοξειδωτικά.	70
Πίνακας 9.	Ελάχιστες Συγκέντρωσεις Αναστολής της Ελευρωπαΐνης και Υδροξυτυροσόλης, κατά των Βακτηρίων.	84
Πίνακας 10.	Κωδικοποίηση Σταδίων Επεξεργασίας.	89
Πίνακας 11.	Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και Ποσότητες των Αντιδραστηρίων. (DPPH).	92
Πίνακας 12.	Έλεγχος Απορρόφησης της Εξεταζόμενης Ουσίας, σε Μεθανόλη. (DPPH).	92
Πίνακας 13.	Η Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και Ποσότητες των Αντιδραστηρίων.(ABTS)	95
Πίνακας 14.	Έλεγχος Απορρόφησης Εξεταζόμενης Συγκέντρωσης , Χωρίς την Προσθήκη του Ενζύμου.	96
Πίνακας 15.	Δείγματα από Επεξεργασμένα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου.	97
Πίνακας 16.	Διακοπτολογία Συσκευής Ακίδας Υπερήχων.	99
Πίνακας 17.	Τεχνικά Χαρακτηριστικά του Mini Spray Dryer B-290.	104
Πίνακας 18.	Συγεντρωτικά Στοιχεία Πειραμάτων με το Spray Dryer.	105
Πίνακας 19.	Τιμές (IC ₅₀), των Επεξεργασμένων Υγρών Αποβλήτων.	109

Πίνακας 20.	Τιμές IC ₅₀ (DPPH – ABTS) του Δείγματος, μετά την Επεξεργασία με την Ακίδα Υπερήχων, με Διαφορετικές Παραμέτρους (Χρόνος Έκθεσης – Ισχύς).	115
Πίνακας 21.	Συγκεντρωτικά Στοιχεία Πειραμάτων με το Spray Dryer (B-290).	120

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.

Εικόνα 1.	Παγκόσμιος χάρτης της καλλιέργειας της ελιάς.	23
Εικόνα 2.	Παραγωγή Ελιάς - Ελαιολάδου - Καλλιεργούμενες Εκτάσεις.	23
Εικόνα 3.	Ελαιολάδο.	27
Εικόνα 4.	Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου.	30
Εικόνα 5	Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου και το Αισθητικό τους Αποτέλεσμα.	33
Εικόνα 6	Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου και το Αισθητικό τους Αποτέλεσμα.	33
Εικόνα 7.	Φαινολικό (Φαινικό) Οξύ: Η Απλούστερη Φαινόλη.	51
Εικόνα 8.	Ονοματολογία - Κοινό Όνομα και Ονοματολογία κατά IUPAC.	51
Εικόνα 9.	Μία Τυπική Αντίδραση Εξουδετέρωσης.	52
Εικόνα 10.	Φυτικής Προέλευσης Πολυφαινόλη, Ταννικό Οξύ. $C_{76}H_{52}O_{46}$.	55
Εικόνα 11.	Οι Φαινολικές Ενώσεις που Υπάρχουν στον Κατσίγαρο.	57
Εικόνα12.	Οι Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων (Niaounakis & Halvadakis, 2006).	58
Εικόνα13.	Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών.	67
Εικόνα 14.	Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.	68
Εικόνα 15.	Οξειδωτικό Στρες.	68
Εικόνα 16.	Δράση Χημειοπροστατευτικών Παραγόντων.	71
Εικόνα 17.	Η αναγωγή του DPPH [•] σε DPPH:H	91
Εικόνα 18.	Η οξειδωση του ABTS σε δραστική ρίζα.	93
Εικόνα 19.	Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS ^{•+}	94
Εικόνα 20.	Συσκευή Υπερήχων.	98
Εικόνα 21.	Σχηματική Παράσταση Πειραματικού Δακτυλίου.	99
Εικόνα 22.	Σχηματική Παράσταση Ροής Υλικού στο Spray Dryer.	103

Εικόνα 22.	Spray Dryer B-290 του Εργαστηρίου.	103
Εικόνα 23.	Αφαίρεση Νερού από το Freeze Dryer.	107
Εικόνα 24.	Χρωματογραφία (HPLC) του Πολυφαινολικού Προφίλ του Προϊόντος.	114

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.

Γράφημα 1.	Παραγωγή Αγροτικών Προϊόντων στη Ελλάδα το έτος 2010.	24
Γράφημα 2.	Παραγωγή Αγροτικών Προϊόντων στη Ελλάδα το έτος 2006.	24
Γράφημα 3.	Διάγραμμα Ροής, με Μερικές Σημαντικές Λειτουργίες στην Επεξεργασία των Υγρών Αποβλήτων.	45
Γράφημα 4.	Φάσεις του CO ₂ με το Τριπλό Σημείο (ΤΣ) και το Κρίσιμο Σημείο (ΚΣ). (300°K = 26,85°C).	62
Γράφημα 5.	Σύγκριση των Αντι-ϊικών Αποτελέσματος της Υδροξυτυροσόλης σε Ιούς.	83
Γράφημα 6.	Επεξεργασία Υγρών Αποβλήτων.	88
Γράφημα 7.	Τιμές (IC ₅₀), των Επεξεργασμένων Υγρών Αποβλήτων.	110
Γράφημα 8.	Μεταβολή Αντοξειδωτικής Ικανότητας (IC ₅₀), σε σχέση με τα Brix.	110
Γράφημα 9.	Αναστολή % των Δειγμάτων 1 και 2 (24,1 Brix), με 1 και 2 Περάσματα, αντίστοιχα με την μέθοδο DPPH.	111
Γράφημα 10.	Αναστολή % των Δειγμάτων 1 και 2 (24,1 Brix), με 1 και 2 Περάσματα, αντίστοιχα, με την μέθοδο ABTS.	111
Γράφημα 11.	Αναστολή % του Δείγματος 18 (0,9 Brix. Στο ξέπλυμα της Ρητίνης).	112
Γράφημα 12.	Αναστολή % του Δείγματος 3 (16,2 Brix. Μετά την Αντίστροφη Όσμωση).	112
Γράφημα 13.	Συσχέτιση των τιμών IC ₅₀ των δύο μεθόδων (DPPH – ABTS).	112
Γράφημα 14.	Η % Αναστολή της ρίζας DPPH*, από το Επεξεργασμένο Δείγμα. (30 min – Ισχύς 10 W).	115
Γράφημα 15.	Η % Αναστολή της ρίζας ABTS**, από το Επεξεργασμένο Δείγμα. (30 min – Ισχύς 10 W).	116
Γράφημα 16.	Τιμές IC ₅₀ (DPPH – ABTS) του Δείγματος, μετά την Επεξεργασία με την Ακίδα Υπερήχων, με Διαφορετικές Παραμέτρους (Χρόνος Έκθεσης – Ισχύς).	116

Γράφημα 17.	Συσχέτιση των τιμών IC ₅₀ των δύο μεθόδων (DPPH – ABTS), μετά την επεξεργασία στην ακίδα υπερήχων.	117
Γράφημα 18.	Τιμές IC ₅₀ DPPH, Κατακρατήματος – Διηθήματος (2.000 Da)	118
Γράφημα 19.	Τιμές IC ₅₀ ABTS, Κατακρατήματος – Διηθήματος (2.000 Da)	118
Γράφημα 20.	Συσχέτιση των τιμών IC ₅₀ των δύο μεθόδων (DPPH – ABTS), μετά την επεξεργασία με μεμβράνη 2.000 Da.	118
Γράφημα 21.	Τιμές IC ₅₀ DPPH και ABTS, Κατακρατήματος Διηθήματος (8.000 Da).	119
Γράφημα 22.	% Αναστολή της Ρίζας DPPH•, από το Δείγμα 7 (Spray Dryer).	121
Γράφημα 23.	% Αναστολή της Ρίζας ABTS ^{•+} , από το Δείγμα 7 (Spray Dryer).	121
Γράφημα 24.	Συσχέτιση των τιμών IC ₅₀ των δύο μεθόδων (DPPH – ABTS), μετά την επεξεργασία με Spray Dryer.	121
Γράφημα 25.	% Αναστολή της Ρίζας DPPH•, από το Δείγμα 1 (Spray Dryer), σε Όξινο pH, σε διαφορετικούς χρόνους.	122

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο αγροτικός τομέας καλείται να αντεπεξέλθει μέσα σε δυσμενείς συνθήκες, όπως αυτές διαμορφώνονται στην εγχώρια αγορά αλλά και στο διεθνές περιβάλλον. Η διατροφική και ενεργειακή κρίση σε συνδυασμό με την οικονομική κρίση αλλά και τον μέχρι τώρα τρόπο διακυβέρνησης της Ε.Ε. επηρέασε και θα επηρεάσει την αγροτική οικονομία και την Κοινή Αγροτική Πολιτική (ΚΑΠ).

Οι σημερινές συνθήκες πλήττουν το αγροτικό εισόδημα, αναστέλλουν την αναδιάρθρωση των αγροτικών εκμεταλλεύσεων, αυξάνουν το κόστος παραγωγής, μειώνουν την παραγωγικότητα, διευρύνουν τις ανισότητες και τις τιμές από τον παραγωγό στο ράφι και βάλλουν την ανταγωνιστικότητα της αγροτικής οικονομίας, σε μεγάλο μέρος της οποίας συμμετέχουν ο τομέας της βιομηχανίας και του εμπορίου.

Χωρίς αμφιβολία, η καλλιέργεια της ελιάς και η παραγωγή ελαιόλαδου πιο συγκεκριμένα, είναι ζήτημα ζωτικής σημασίας για την οικονομία της χώρας και την ανάπτυξη της επαρχίας ειδικότερα. Το γεγονός ότι η Ελλάδα κατέχει την τρίτη θέση στον κόσμο στον τομέα αυτό, καθιστά την ελαιοκαλλιέργεια ως μια από τις σημαντικότερες δραστηριότητες του πρωτογενούς τομέα παραγωγής. Ο χαρακτηρισμός του έτους 2006 ως “έτος ελιάς και ελαιόλαδου” μόνο τυχαίος δεν μπορεί να χαρακτηρισθεί, καθώς αναδεικνύει την εθνική διάσταση του ζητήματος και αποδίδει στο ελαιόλαδο τον τίτλο «εθνικό προϊόν».

Επιπλέον, υπάρχουν πολλές μελέτες που υποστηρίζουν πως η μεσογειακή δίαιτα ως ένα υγιές μοντέλο διατροφής, συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου. Αν η μεσογειακή δίαιτα εισαχθεί σε χώρες με την τυπική δυτική δίαιτα, ο συνολικός κίνδυνος του καρκίνου θα μπορούσε να μειωθεί κατά 10% και ειδικότερα ο κίνδυνος του ορθοκολικού και άλλων καρκίνων του πεπτικού συστήματος μπορεί να μειωθεί έως και 25%. (Giacosa A., et.al., 2012). Φυσικά, η παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή, βασίζεται στην πλούσια ποικιλία των φυτικών τροφών, στην υψηλή κατανάλωση δημητριακών, στο ελαιόλαδο, στην χαμηλή κατανάλωση κρέατος και στην μέτρια κατανάλωση κρασιού.

Η ολοκλήρωση της διαδικασίας στην παραγωγή του ελαιολάδου, εμπεριέχει ως γνωστό και την παραγωγή των αποβλήτων. Ένα σπουδαίο κεφάλαιο το οποίο θα πρέπει να απασχολεί σοβαρά, όχι μόνον τους εμπλεκόμενους φορείς, αλλά και τον κάθε Έλληνα πολίτη.

Αυτό επισημαίνεται γιατί, τα απόβλητα των ελαιουργείων, αν και παραπροϊόντα επεξεργασίας του ελαιοκάρπου, συγκαταλέγονται στα κατ'εξοχήν βεβαρημένα από πλευράς ρυπαντικού φορτίου γεωργικά βιομηχανικά απόβλητα. Συγκεκριμένα, ένα μεσαίου μεγέθους ελαιοτριβείο, παράγει περίπου 1.000 tn απόβλητα ανά περίοδο συγκομιδής ελαιοκάρπου, με οργανικό φορτίο το οποίο ισοδυναμεί με τα ετήσια απόβλητα μιας πόλης 30.000 κατοίκων.

Από τα συστατικά των υγρών αποβλήτων (κασιίγαρος), ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φαινόλες, οι οποίες ως αντιοξειδωτικές ουσίες εμποδίζουν τη διάσπαση των λιπαρών οξέων και βοηθούν στη διατήρηση του λαδιού, δεν το αφήνουν δηλαδή να οξειδωθεί, (Tsimidou et al., 1992 ; Ryan & Robards et.al., 1998). Είναι όμως η κύρια ρυπαντική παράμετρος, η οποία ευθύνεται για τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων.

Εάν σκεφτούμε μεθόδους απομόνωσης των πολυφαινολών, από το υπόλοιπο φορτίο των υγρών αποβλήτων, τότε δεν θα μιλάμε για απόβλητα ελαιοτριβείου, αλλά για ένα προϊόν που μόνο κακό δεν κάνει.

Από την άλλη πλευρά, εφόσον απομωνωθούν οι πολυφαινόλες και εκτιμηθούν οι αντιοξειδωτικές ικανότητές τους, διαγράφονται θετικά μηνύματα, για την εμπορική τους αξία, μέσα στην διεθνή αγορά.

Η παρούσα εργασία, έχει σαν σκοπό την απομόνωση – επεξεργασία πολυφαινολικών συστατικών σε μορφή εκχυλίσματος και σκόνης, υψηλής προστιθέμενης αξίας, από τα απόβλητα ελαιοτριβείου, καθώς και στον έλεγχο της αντιοξειδωτικής τους δράσης, έτσι ώστε, με την κατάλληλη προσθήκη αυτών σε ποτό, τρόφιμο ή φαρμακευτικό σκεύασμα, να προσδίδονται οι θετικές ιδιότητες του ελαιολάδου.

1.1 Η Παραγωγή Ελαιολάδου και τα Απόβλητά της.

1.1.1. Η καλλιέργεια της ελιάς.

Η προέλευση του ελαιόδεντρου (*Olea europaea*), χάνεται στα βάθη του χρόνου. Οι πρώτες καλλιέργειες της ελιάς τοποθετούνται στο 6.000 π.Χ στην περιοχή της Συρίας. Στη συνέχεια, μέσω του εμπορίου, το ελαιόδεντρο και η τεχνική της καλλιέργειας εξαπλώθηκαν στην Κύπρο, στην Ελλάδα και στη νότιο Αφρική. Ήδη, από το 1500 π.Χ. το ελαιόλαδο αποτελούσε κύριο εμπορικό προϊόν των Κρητών.

Οι αρχαίοι Έλληνες θεωρούσαν την ελιά ως σύμβολο ευφορίας, εξαγνισμού, τιμής, νίκης και ειρήνης. Ο συμβολικός χαρακτήρας της ελιάς και του ελαιολάδου πέρασε στη χριστιανική θρησκεία και παράδοση, η οποία διατηρήθηκε ως τις μέρες μας. Από την αρχαιότητα είχε αναγνωριστεί στο ελαιόλαδο η ιδιαίτερη συνεισφορά του σε θέματα υγείας και ο Ιπποκράτης είχε αναφερθεί σε αυτό ως «το μέγα φάρμακο».

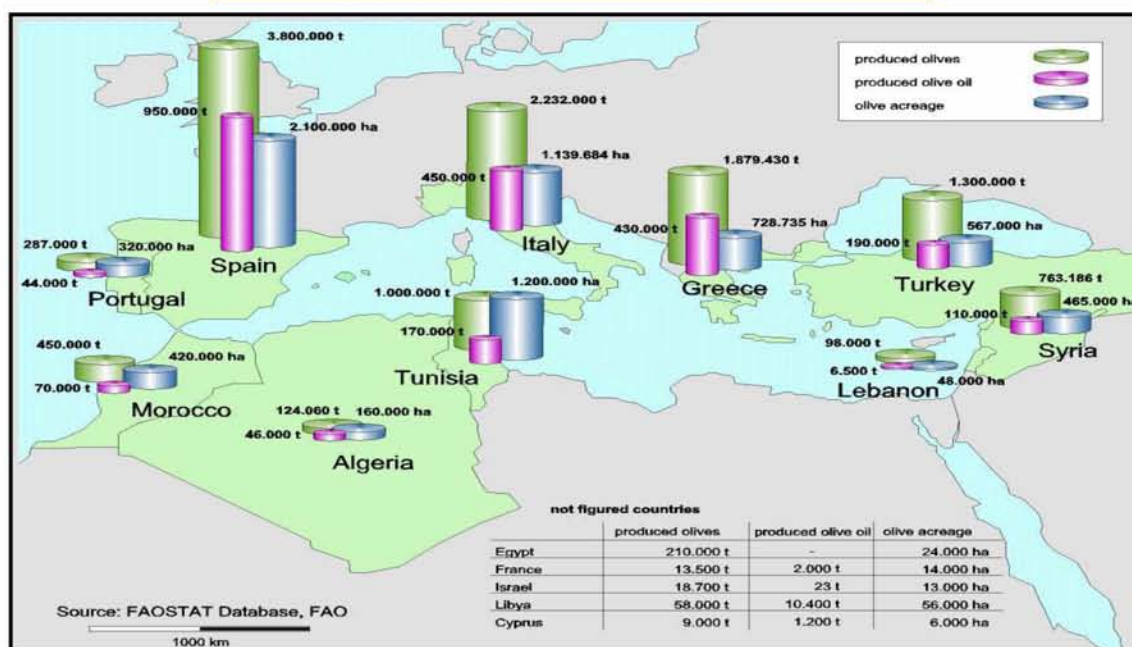
Σήμερα, οι περισσότερες εμπειριστατωμένες έρευνες και μελέτες έχουν αναδείξει το ελαιόλαδο, ως ένα από τα σημαντικότερα προϊόντα υγιεινής διατροφής. Θεωρείται ότι συμβάλλει στην μείωση των καρδιακών νοσημάτων, της χοληστερόλης και παρεμποδίζει την εμφάνιση καρκίνου, ενώ οι **πολυφαινόλες** του ελαιολάδου, οι οποίες αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά επιδρούν ευεργετικά στην πρόληψη ή και θεραπεία πολλών άλλων νοσημάτων (Visioli F., Galli, C. 1998, Owen et al. 2000, Andrikopoulos et al. 2002).

Η βιομηχανία παραγωγής ελαιολάδου αποτελεί μια από τις σημαντικότερες βιομηχανίες τροφίμων στη χώρα μας. Υπάρχουν πάνω από 686.000 καλλιεργητές της ελιάς (οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το 6,5% του συνολικού πληθυσμού) και οι οποίοι φροντίζουν 137 εκατομμύρια ελαιόδεντρα. Οι καλλιεργούμενες με ελιά εκτάσεις στη χώρα μας αποτελούν το 18,5% της συνολικής γεωργικής γης, οι οποίες δίνουν περίπου, μια παραγωγή 1.880.000 τόνους ελιάς ανά έτος.

Στην Εικόνα 1, δίνεται ο παγκόσμιος χάρτης της καλλιέργειας της ελιάς και στην Εικόνα 2, δίνονται η παραγωγή ελιάς και ελαιολάδου καθώς και οι καλλιεργούμενες εκτάσεις στη Μεσόγειο.

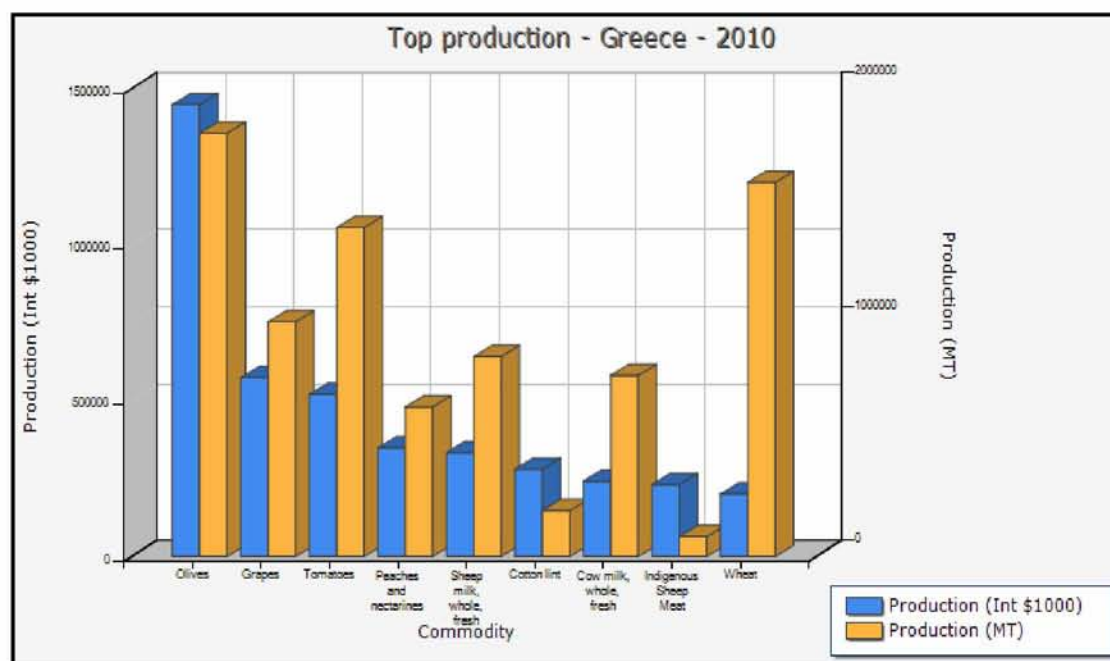


Εικόνα 1. Παγκόσμιος χάρτης της καλλιέργειας της ελιάς.
(<http://www.internationaloliveoil.org/eng/index.html>)



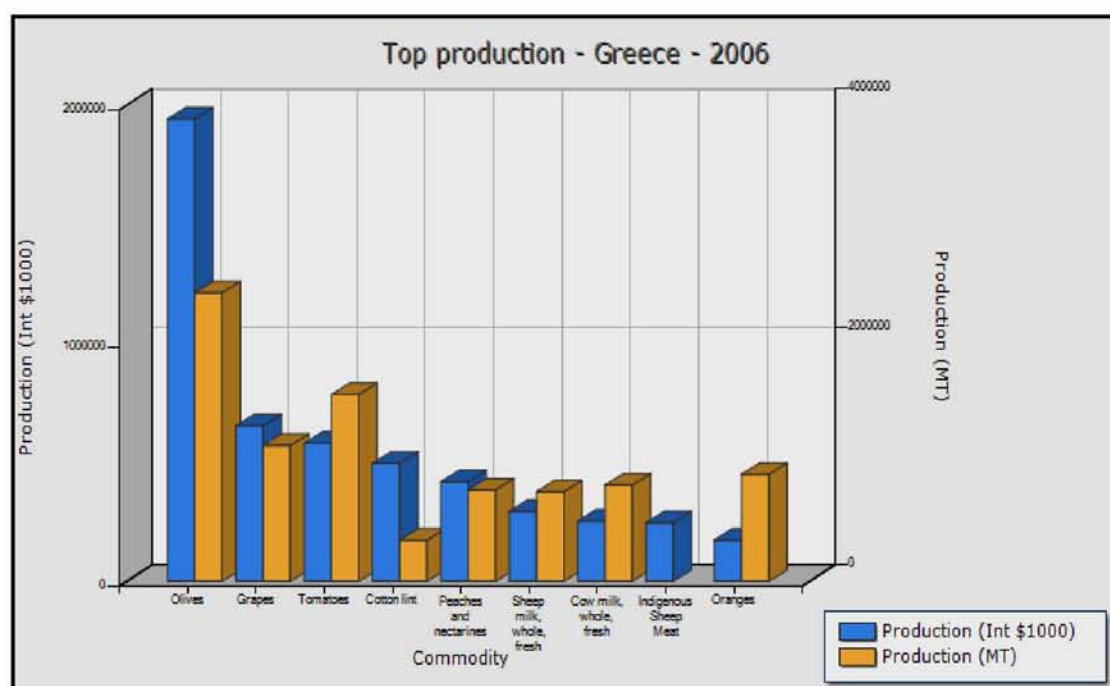
Εικόνα 2. Παραγωγή Ελιάς - Ελαιολάδου - Καλλιεργούμενες Εκτάσεις.
(<http://www.fiw.rwth-aachen.de/cms/index.php?id=349>)

1.1.2. Στατιστικά Στοιχεία F.A.O. (Food and Agriculture Organization).



Γράφημα 1. Παραγωγή Αγροτικών Προϊόντων στη Ελλάδα το έτος 2010.
(<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>)

Η Παραγωγή της Ελιάς κατέχει την Πρώτη Θέση. Το ίδιο ισχύει και για το έτος 2006, αλλά παρατηρείται πως ενώ υπάρχει λίγο μεγαλύτερη παραγωγή σε μετρικούς τόννους, έχουμε πολύ περισσότερα έσοδα, από το 2010.



Γράφημα 2. Παραγωγή Αγροτικών Προϊόντων στη Ελλάδα το έτος 2006.

Τα τελευταία χρόνια, παρά την υψηλή παραγωγή ελαιόλαδου, οι παραγωγοί βρίσκονται σε δεινή οικονομική κατάσταση, καθώς η τιμή στην οποία πωλούν αυτοί το προϊόν τους συνεχώς ολισθαίνει. Επισημαίνεται ότι η τιμή του παραγωγού το 2006 ήταν 3 ευρώ/κιλό, το 2007 ήταν 3,8 ευρώ/κιλό, το 2008 2,5 ευρώ/κιλό και το 2009 μόλις 1,7 ευρώ/κιλό. Υπό αυτές τις συνθήκες οι παραγωγοί βρίσκονται σε συνεχή οικονομική κατάρρευση και αναγνωρίζεται η αναγκαιότητα στήριξης του κλάδου από την πολιτεία.

1.1.3. Είδη, Ποιοτικά Χαρακτηριστικά & Κριτήρια Αξιολόγησης του Ελαιολάδου.

Η ποιοτική κατάταξη του ελαιολάδου, ακολουθεί συγκεκριμένη μεθοδολογία και υπακούει σε διεθνείς σταθερές όπως αυτές προβλέπονται από τους κανονισμούς που έχει εφαρμόσει το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (International Olive Council), το οποίο έχει συσταθεί ακριβώς για την προστασία της ποιότητας του ελαιολάδου και των καταναλωτών. Για τη εγγύηση της ποιότητας του ελαιολάδου έχει σχεδιαστεί ένα ευρύ και τεκμηριωμένο Σύστημα Διασφάλισης Ποιότητας, το οποίο ακολουθεί σαφείς και συγκεκριμένες διαδικασίες.

Ως ποιότητα, εκφράζεται «το σύνολο των χαρακτηριστικών μιας υπηρεσίας ή ενός προϊόντος, που ικανοποιούν εκφρασμένες ή συνεπαγόμενες ανάγκες». Στόχος αυτού του Συστήματος είναι να αποδεικνύεται, όταν αυτό απαιτείται, ότι μια επιχείρηση ικανοποιεί συγκεκριμένες απαιτήσεις για ποιοτικά και ασφαλή προϊόντα. Η παροχή όλης της σχετικής πληροφόρησης προάγει και την εμπιστοσύνη του καταναλωτή στα προϊόντα μίας επιχείρησης.

Σύμφωνα με το Παράρτημα I του Κοινοτικού Κανονισμού 865/04 «σχετικά με την Κοινή Οργάνωση Αγοράς Ελαιολάδου και Επιτραπέζιων Ελιών» οι ποιοτικές κατηγορίες των ελαιολάδων και των πυρηνελαίων επιτρέπεται να διακινούνται και να πωλούνται ενδοκοινοτικά, εφόσον περιγράφονται με τους παρακάτω χαρακτηρισμούς.

1.1.3.1. Επίσημες Ποιοτικές Κατηγορίες Ελαιολάδου.

1.1.3.1i. Παρθένα Ελαιόλαδα.

Έλαια που λαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο μόνο με μηχανικές μεθόδους ή άλλες φυσικές επεξεργασίες, με συνθήκες που δεν προκαλούν αλλοίωση του ελαίου και τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρισης και της διήθησης. Εξαιρούνται τα έλαια που λαμβάνονται με διαλύτες, με βοηθητικές ύλες παραλαβής που έχουν χημική ή βιοχημική δράση, ή με μεθόδους επανεστεροποίησης ή πρόσμειξης με έλαια άλλης φύσης. Τα έλαια αυτά κατατάσσονται και ταξινομούνται αναλυτικά με τις ακόλουθες ονομασίες:

α) Εξαιρετικό ή έξτρα Παρθένο Ελαιόλαδο (virgin olive oil - extra).

Το ελαιόλαδο, του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (οξύτητα), δεν υπερβαίνει τα 0,8 g ανά 100 g (0,8%) και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

β) Παρθένο Ελαιόλαδο.

Το ελαιόλαδο η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 2,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

γ) Ελαιόλαδο Λαμπάντε.

Το ελαιόλαδο του οποίου η οξύτητα είναι μεγαλύτερη του 2,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

1. 1.3.1.ii Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο.

Το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από τον εξευγενισμό παρθένων ελαιολάδων, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 0,3 % και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

1.1.3.1.iii Ελαιόλαδο-αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα.

Το έλαιο που λαμβάνεται από ανάμειξη εξευγενισμένου ελαιολάδου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 1,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

1.1.3.1.iv Ακατέργαστο Πυρηνέλαιο.

Το έλαιο που λαμβάνεται από τους πυρήνες της ελιάς, κατόπιν επεξεργασίας με διαλύτες ή με φυσικά μέσα ή το έλαιο που αντιστοιχεί (με εξαίρεση ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά), σε ελαιόλαδο λαμπάντε.

1.1.3.1.v. Εξευγενισμένο Πυρηνέλαιο.

Το έλαιο που λαμβάνεται από τον εξευγενισμό του ακατέργαστου πυρηνελαίου, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 0,3% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

1.1.3.1.vi. Πυρηνέλαιο.

Το έλαιο που λαμβάνεται από ανάμειξη εξευγενισμένου πυρηνελαίου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 1,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.



Εικόνα 3. Ελαιόλαδο .

1.1.4. Πώς Καθορίζεται η Ποιότητα του Ελαιολάδου;

Η γνησιότητα και η ποιότητα των ελαιολάδων προσδιορίζονται με βάση τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, όπως αυτά προβλέπονται στον Κανονισμό (ΕΟΚ) **2568/91**. Προκειμένου τα χαρακτηριστικά αυτά να ελέγχονται με ενιαίο τρόπο, ο ίδιος κανονισμός καθορίζει και τις μεθόδους χημικής ανάλυσης και οργανοληπτικής αξιολόγησης.

Η ποιότητα του ελαιολάδου υποβαθμίζεται σημαντικά ακόμη και κατά το στάδιο ανάπτυξης του καρπού κατά την επαφή του με παράσιτα, μικροοργανισμούς, υγρασία, οξυγόνο, έντονο φως, θερμοκρασία και προσδιορίζεται με την οργανοληπτική αξιολόγηση (panel test) και με τη μέτρηση ορισμένων φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως οξύτητα, αριθμός υπεροξειδίων, συντελεστές απορρόφησης K270/K232/ΔK κ.λ.π.

Οι φυσικοχημικές παράμετροι βάσει των οποίων χαρακτηρίζεται η ποιότητα του ελαιολάδου είναι οι ακόλουθες:

1.1.4.1. Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά του Ελαιολάδου.

α. Οξύτητα. Υψηλή οξύτητα συνήθως σημαίνει ότι το ελαιόλαδο προέρχεται από τάλαιπωρηνό ελαιόκαρπο ή ακατάλληλες συνθήκες ελαιοποίησης.

β. Υπεροξείδια. Τα υψηλά υπεροξείδια υποδηλώνουν ότι το ελαιόλαδο έχει υποστεί οξειδωτικές ή άλλες αλλοιώσεις.

γ. Κήροι (Ένδειξη παρουσίας πυρηνελαίου).

δ. Κορεσμένα Λιπαρά Οξέα στη Θέση 2. (Παρουσία εστερεοποιημένων «συνθετικών» ελαίων).

ε. Στιγμασταδιένια. (Ένδειξη παρουσίας ραφινέ ελαίων σε παρθένα ελαιόλαδα).

στ. ΔECN 42 (Ένδειξη παρουσίας σπορέλαιων).

ζ. K 232 (Δείκτης αρχικών σταδίων οξείδωσης).

η. K 270 (Δείκτης προχωρημένου σταδίου οξείδωσης).

θ. ΔK (Μαθηματική σχέση υπολογισμού συντελεστών απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας).

ι. Οργανοληπτική Αξιολόγηση. (Στατιστική μέθοδος προσδιορισμού οργανοληπτικών χαρακτηριστικών).

ια. Μυριστικό, Λινολενικό, Αραχιδικό, Εικοσενικό, Βεχενικό, Λιγνοκηρικό οξύ. (Περιεκτικότητες μεγαλύτερες των ποσοστών των επιτρεπτών ορίων, υποδηλώνουν αντίστοιχα την παρουσία κάποιου σπορέλαιου).

ιβ. Trans Ισομερή Λιπαρά Οξέα. (Ένδειξη παρουσίας ραφινέ ελαίων σε παρθένα ελαιόλαδα).

ιγ. Χοληστερόλη. (Πιθανή ένδειξη παρουσίας ζωικού λίπους).

ιδ. Βρασικαστερόλη. (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιου).

ιε. Καμπεστερόλη. (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιου).

- ιστ. Στιγμαστερόλη. (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιου).
- ιζ. Συνολική β-Σιτοστερόλη. (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιου).
- ιη. δ7-Στιγμαστερόλη. (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιου).
- ιθ. Συνολικές Στερόλες. (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιων).
πυρηνελαίων)
- κ. Ερυθροδιόλη και Ουβαόλη. (Πιθανή ένδειξη παρουσίας
πυρηνελαίου).
- κα. Αλογονωμένοι Διαλύτες. (Επιμόλυνση του ελαιολάδου με διάφορα
τοξικά).

Πηγή: http://www.gge.gr/up/files/elaiol_typo.pdf

1.1.5. Απόβλητα Ελαιουργείων.

Κατά την κατεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιουργεία, παράλληλα με το ελαιόλαδο, παράγεται και μία σειρά παραπροϊόντων. Αυτά είναι:

- α. Ο ελαιοπυρήνας, που αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά του καρπού (κυρίως του κουκουτσιού),
- β. Τα ελαιόφυλλα, που έχουν μεταφερθεί με τον ελαιοκάρπο και
- γ. Μία σημαντική σε όγκο και οργανικό φορτίο ποσότητα υγρών αποβλήτων, που είναι γνωστά ως "λιοζούμι", "κατσίγαρος" ή "μούργα". Ο κατσίγαρος συνίσταται από το υδατικό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και από το νερό που χρησιμοποιείται στις διάφορες φάσεις παραγωγής του λαδιού στο ελαιουργείο.

Ουσιαστικά, πρόκειται για ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, που περιέχει μία σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, πολυαλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα ελαίου. Η άμεση επίπτωση του κατσίγαρου στο περιβάλλον είναι η αισθητική υποβάθμιση που προκαλεί και η οποία οφείλεται στην έντονη οσμή του και στο σκούρο χρώμα του.

Παράλληλα, εξαιτίας του υψηλού οργανικού φορτίου που περιέχει, είναι πιθανόν να δημιουργήσει ευτροφικά φαινόμενα σε περιπτώσεις που καταλήγει σε αποδέκτες με μικρή ανακυκλοφορία νερών (κλειστούς θαλάσσιους κόλπους, λίμνες κ.τ.λ).



Εικόνα 4. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου.

1.1.6. Η Ισχύουσα Ελληνική Νομοθεσία για τα Ελαιοτριβεία.

Η διαχείριση των ΥΑΕ δεν διέπεται από συγκεκριμένες νομοθετικές οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα απόβλητα αυτά παράγονται ως επί το πλείστον σε χώρες της Μεσογείου.

Η Κοινοτική Οδηγία 91/271/EEC με θέμα «Επεξεργασία αστικών υγρών αποβλήτων», αφορά μόνο στην προστασία του περιβάλλοντος από τις επιβλαβείς επιπτώσεις, λόγω διάθεσης αστικών και αγροτικών υγρών αποβλήτων. Κατά συνέπεια, είναι απαραίτητη η κατάλληλη επεξεργασία των υγρών αποβλήτων πριν την διάθεσή τους σε υδατικούς αποδέκτες και μόνο σε περίπτωση προ-επεξεργασίας υπάρχει δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής τους (Zaharaki and Komnitsas, 2009).

Η σημαντικότερη ελληνική νομοθεσία που αφορά τα ελαιοτριβεία είναι η εξής:

1. ΝΟΜΟΣ ΥΠ. ΑΡΙΘΜ. 2516/97: «Ίδρυση και λειτουργία βιομηχανικών και βιοτεχνικών εγκαταστάσεων και άλλες διατάξεις» (ΦΕΚ 159/Α/8-8-97). Σύμφωνα με το άρθρο 1 και με βάση την κινητήρια εγκατεστημένη ισχύ που είναι πάνω από 16HP, τα ελαιοτριβεία νοούνται ως Βιομηχανία ή Βιοτεχνία. Στο άρθρο 18, παράγραφος 2, αναφέρεται ότι : «Για την χορήγηση νέας άδειας λειτουργίας αόριστης χρονικής ισχύος απαιτείται να έχει εξασφαλιστεί προηγουμένως η πλήρη συμμόρφωση των φορέων προς τις κείμενες διατάξεις περί προστασίας του περιβάλλοντος και υγιεινής των εργαζομένων και περιοίκων....».

2. ΚΥΑ 69269/5387/90: «Κατάταξη έργων και δραστηριοτήτων σε κατηγορίες, περιεχόμενο μελέτης περιβαλλοντικών επιπτώσεων, καθορισμός

περιεχομένου ειδικών περιβαλλοντικών μελετών και λοιπές συναφείς διατάξεις, σύμφωνα με τον Ν. 1650/86» (ΦΕΚ 678B/25-10-90).

3. ΚΥΑ 10537/93: «Καθορισμός αντιστοιχίας της κατάταξης των βιομηχανικών – βιοτεχνικών δραστηριοτήτων της ΚΥΑ 69269/90 με την αναφερόμενη στις πολεοδομικές ή άλλες διατάξεις διάκριση των δραστηριοτήτων σε χαμηλή, μέση και υψηλή όχληση» (ΦΕΚ 139B/11-3-93). Σύμφωνα με το άρθρο 1, τα ελαιοτριβεία κατατάσσονται στις δραστηριότητες χαμηλής όχλησης.

4. ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ Ε1β/221: «Περί διαθέσεως λυμάτων και βιομηχανικών αποβλήτων» (ΦΕΚ 138/B/24-12-1965). Η Διάταξη αυτή του Υπουργείου Υγείας και Πρόνοιας, θέτει ουσιαστικά τα πλαίσια μέσα στα οποία πρέπει να κινούνται οι βιομηχανίες όσον αφορά την επεξεργασία και διάθεση των αποβλήτων τους. Στο άρθρο 1 δίνονται οι ορισμοί των «λυμάτων», βιομηχανικών αποβλήτων», «επεξεργασίας» κ.α. Το άρθρο 2 αναφέρεται με γενικούς όρους όσον αφορά την διάθεση των λυμάτων και στα άρθρα 3 και 4 παρουσιάζονται τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχουν τα επιφανειακά και τα θαλάσσια νερά ανάλογα με τις χρήσεις τους. Στην συνέχεια, στα άρθρα 7 και 8 θέτονται οι όροι για τη διάθεση των λυμάτων και των βιομηχανικών αποβλήτων στο έδαφος και στο υπέδαφος. Τα άρθρα 9 έως 13 αναφέρονται στους όρους και στις μεθόδους που πρέπει να τηρούν και να ακολουθούν μεμονωμένες μονάδες (κατοικίες, σχολεία, ξενοδοχεία, κ.α.) κατά την επεξεργασία των λυμάτων τους.

Τέλος, στα άρθρα 14, 15 και 16 καθορίζονται ο τρόπος και οι απαιτήσεις για την αδειοδότηση της διάθεσης λυμάτων ή βιομηχανικών αποβλήτων, η ισχύς της Διατάξεως και οι κυρώσεις και επίσης δίνονται μεταβατικές διατάξεις για τις υφιστάμενες εγκαταστάσεις διαθέσεως των λυμάτων και μέθοδοι εξετάσεως βιομηχανικών αποβλήτων ή υδάτων.

5. Μια σημαντική οδηγία εφαρμογής της Υ.Δ. Ε1β/221 που κοινοποιήθηκε με την εγκύκλιο του ΥΚΥ με αριθμό A5/4690/ΕΓΚ.62/26-4-80, αναφέρει τους όρους για τη χορήγηση άδειας διαθέσεως λυμάτων ή βιομηχανικών αποβλήτων, τον τρόπο ανανέωσης προσωρινής άδειας διαθέσεως τους και στοιχεία για τον έλεγχο αποδόσεως των εγκαταστάσεων επεξεργασίας.

Στο παράρτημα 1 της Οδηγίας υπάρχουν τα προτεινόμενα

χαρακτηριστικά ποιοτικών παραμέτρων, για τον έλεγχο των βιομηχανικών αποβλήτων κατά κλάδο και είδος βιομηχανίας.

Έτσι, στην κατηγορία Βρώσιμα Λίπη και Έλαια του κλάδου Τροφών και Ποτών, οι τακτικοί ποιοτικοί παράμετροι που πρέπει να εξετάζονται είναι:

α. Το BOD (*Biochemical Oxygen Demand = Βιοχημικώς Απαιτούμενο Οξυγόνο*), που είναι η συνήθως χρησιμοποιούμενη παράμετρος, για την μέτρηση του οργανικού φορτίου των λυμάτων και ρυπασμένων υδάτινων σωμάτων. Αξίζει να αναφερθεί πως, το BOD μίας ποσότητας νερού, ορίζεται ως η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου, που χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί, για την πλήρη βιοχημική οξείδωση των περιεχομένων οργανικών υλών.

β. Το COD (*Chemical Oxygen Demand = Χημικώς Απαιτούμενο Οξυγόνο*), που είναι η ποσότητα του οξυγόνου, η οποία απαιτείται για την πλήρη χημική οξείδωση της οργανικής ύλης σε CO₂ και νερό.

γ. Τα Αιωρούμενα και τα Διαλυμένα Στερεά.

δ. Λίπη, Έλαια και pH.

ε. Άζωτο.

στ. Φώσφορος.

ζ. Θειικά και Θειούχα κατά περίπτωση.

6. Η πιο πρόσφατη υπουργική εγκύκλιος ΥΜ/5784/23-1-1992 (No 4419/23-10-1992), αναφέρεται σε προβλήματα που προκαλούνται από την διάθεση των ΥΑΕ και την αναγκαιότητα ανάπτυξης μεθόδων προ-επεξεργασίας ώστε να αποφεύγεται η απευθείας διάθεση σε υδατικούς αποδέκτες. Οι εκάστοτε Νομαρχίες παλαιά και σήμερα πλέον, οι εκάστοτε Περιφέρειες, είναι οι αρμόδιοι φορείς για τη υιοθέτηση κατάλληλων μεθόδων διαχείρισης.

1.2. Η Σύσταση των Αποβλήτων του Ελαιοτριβείου.



Εικόνες 5 και 6. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου και το Αισθητικό τους Αποτέλεσμα.

Τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου, χαρακτηρίζονται από:

- Έντονα ιώδες-σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα.
- Πολύ έντονη μυρωδιά ελαιολάδου.
- Πολύ μεγάλο οργανικό φορτίο (τιμές COD μέχρι και 220g/l).
- Τιμές pH μεταξύ 3 και 6.
- Υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα .
- Μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων (από 0,5 έως 24g/l).
- Μεγάλη περιεκτικότητα σε στερεή ουσία.

Τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου, ανήκουν στα Γεωργικά απόβλητα, που το εύρος των τιμών τους, επηρεάζεται από παράγοντες όπως:

- Κλιματολογικές συνθήκες.
- Ποικιλία ελιών.
- Ηλικία ωρίμανσης των καρπών.
- Χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων.
- Τύπος εδάφους.
- Τύπος τεχνολογίας παραγωγής.
- Χρόνος συγκομιδής και αποθήκευσης, πριν την επεξεργασία.

	Vlyssides et al., 1996		Di Giovacchino & Mascolo, 1988	
Παράμετρος	Πίεσης	3- φασικό	Πίεση	3-φασικό
Ολικά στερεά, g/l	99,7	63,5	129.7	61.1
Ολικά αιωρούμενα στερεά, g/l	4,51	2,80		
Ολικά πτητικά στερεά, g/l	87,2	57,4		
Στάχτη, g/l	9,69	6,13	20	6.4
Ολικός οργανικός άνθρακας, g/l	64,1	39,8		
Ολικό άζωτο Kjeldahl, g/l	1,15	0,76		
Φώσφορος (P ₂ O ₅), g/l	0,87	0,53		
pH	4,50	4,80	5.27	5.23
BOD ₅ , mg/l	68.700	45.500		
COD, mg/l	158.000	92.500	146.000	85.700
Ειδικό βάρος, g/cm ³	1,05	1,05	1.049	1.020
Αγωγιμότητα, mmhos/cm	18,0	12,0		
Ολικά σάκχαρα, g/l	25,9	16,1	35.8	15.9
Λίπη και έλαια, g/l	2,80	1,64	2.26	5.78
Πολυαλκοόλες, g/l	4,75	3,19		
Ολικές φαινόλες, g/l	17,2	10,6	6.2	2.7
Ταννίνες, g/l	6,74	4,01		
Κάλιο (K ₂ O), g/l	3,77	2,37	2.98	1.14
Νάτριο (Na ₂ O), mg/l	406	243	148	48.5
Ασβέστιο (CaO), mg/l	382	271	227	96,6
Σίδηρος (FeO), mg/l	48,3	32,0	42.3	18,0
Μαγνήσιο (MgO), mg/l	74,0	50,0	322	149
Πυρίτιο (SiO ₂), mg/l	28,6	18,0		
Ολικό θείο, mg/l	101	63,0		
Χλώριο, mg/l	219	124		
Mn, mg/l	18,2	12,0	5.32	1.55
Zn, mg/l	19,7	12,0	3.57	2.06
Cu, mg/l	10,50	6,00	3.12	1.59

Πίνακας 1. Σύσταση των Αποβλήτων των Ελαιοτριβείων.

Από τα συστατικά που περιέχονται στον κατσίγαρο, **οι πολυφαινόλες** παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι από τη μία πλευρά προσδίδουν στα απόβλητα τοξικές ιδιότητες έναντι των φυτών και αποδομούνται με βραδύ σχετικά ρυθμό, από εξειδικευμένες ομάδες μικροοργανισμών, ενώ από την άλλη είναι υπεύθυνες για τη συντήρηση της ποιότητας του λαδιού στο χρόνο (χαμηλή οξύτητα) ως φυσικό συντηρητικό.

Επειδή, η παραγωγή του ελαιολάδου είναι μία φυσική διαδικασία, πρέπει να σημειωθεί ότι ο κατσίγαρος δεν περιέχει άλλες ουσίες που είναι ιδιαίτερα τοξικές, όπως τα βαρέα μέταλλα και οι συνθετικές οργανικές ενώσεις..

Το υψηλό οργανικό φορτίο του κατσίγαρου, σε συνάρτηση με την παρουσία των πολυφαινολών, δεν επιτρέπει την απευθείας διάθεση του στο περιβάλλον, αλλά καθιστά αναγκαία την πρότερη επεξεργασία του.

Για την επεξεργασία και διάθεση του κατσίγαρου έχουν δοκιμαστεί διάφορες μέθοδοι σε εργαστηριακή και πραγματική κλίμακα. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν έχει προταθεί μία ολοκληρωμένη λύση, αλλά έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές κατά περίπτωση, που παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα τεχνικής ή οικονομικής φύσεως και δεν έχουν επιλύσει ικανοποιητικά το πρόβλημα.

1.3. Μέθοδοι Επεξεργασίας και Χρήσεις Αποβλήτων Παραγωγής Ελαιολάδου.

1.3.1. Ιστορικό.

Ο εκσυγχρονισμός των ελαιοτριβείων και η αύξηση παραγωγής ελαιολάδου τα τελευταία χρόνια, είχαν σαν συνέπεια την παραγωγή αυξημένου όγκου αποβλήτων, που κατέταξε την Κρήτη, πρώτη στην Ελλάδα σε παραγωγή κασιίγαρου με ποσότητα 700.000 ton/έτος, με δεύτερη την Πελοπόννησο με 400.000 ton/έτος, και ακολουθούν τα Ιόνια νησιά με 220.000 ton/έτος, η Στερεά Ελλάδα με την Εύβοια με 200.000 ton/έτος, τα νησιά του Αιγαίου με 700 ton/έτος, η Ηπειρωτική Ελλάδα με 600 ton/έτος και η Μακεδονία με 500 ton/έτος. Οι κύριοι αποδέκτες των αποβλήτων αυτών σήμερα, όπως τα παρακολουθούμε σήμερα είναι:

α) Το υδατικό περιβάλλον, με άμεσους αποδέκτες, τους χείμαρρους, τα ποτάμια, τα μικρά και μεγάλα φράγματα, όπου και καταλήγει το 80-90% του συνολικού όγκου των παραγομένων αποβλήτων και με τελικούς αποδέκτες τη θάλασσα και τα υπόγεια νερά, προκαλώντας τη μείωση της βιοποικιλότητας, ενώ παράγονται τοξικές ουσίες για τον άνθρωπο και τα ζώα.

β) Το έδαφος, όπου προκαλείται φυτοτοξικότητα σε διάφορα είδη φυτών ή και ρύπανση των υπογείων και επιφανειακών υδάτων.

γ) Οι καταβόθρες, που οδηγούν κατευθείαν στα υπόγεια υδροφόρα στρώματα με αποτέλεσμα τη ρύπανσή τους.

Για την οριστική επίλυση του προβλήματος, τέθηκαν από τις διεθνείς συναντήσεις για τον κασιίγαρο, κριτήρια που πρέπει να πληρούνται, ώστε μια μέθοδος να γίνει αποδεκτή και υλοποιήσιμη. Αυτά είναι:

- 1) Πλήρης και οριστική επίλυση του περιβαλλοντικού προβλήματος.
- 2) Εξουδετέρωση της φυτοτοξικότητας.
- 3) Πλήρης ανάκτηση και ανακύκλωση όλων των χρήσιμων υποπροϊόντων του κασιίγαρου (νερό καλής ποιότητας, λάδι άριστης ποιότητας, αλλά και βιομηχανικής χρήσης).
- 4) Δυνατότητα παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας και
- 5) Βιωσιμότητα της μονάδας.

1.3.2. Μέθοδοι Επεξεργασίας και Διάθεσης του Κατσιγάρου. (Γενικά).

Οι άδειες λειτουργίας των ελαιοτριβείων χορηγούνται υπό την προϋπόθεση εφαρμογής κατάλληλων μεθόδων διαχείρισης των ΥΑΕ, όπως είναι η διάθεση σε κατάλληλα διαμορφωμένες εξατμισοδεξαμενές, η επεξεργασία με υδράσβεστο πριν τη διάθεση και ο κλασματικός διαχωρισμός μέσω φυσικής καθίζησης όπου λαμβάνει χώρα περαιτέρω διαχείριση του κάθε κλάσματος ξεχωριστά. Ωστόσο, δεν υπάρχει μια και μόνο μέθοδος η οποία μπορεί να εξασφαλίσει αποδοτική επεξεργασία των ΥΑΕ και με χαμηλό κόστος εφαρμογής για μια ελαιοπαραγωγική μονάδα, δεδομένης της γεωγραφικής διασποράς των ελαιοτριβείων και του μικρού μεγέθους των εγκαταστάσεων (Paraskeva and Diamadopoulos, 2006).

Συγκεκριμένα, έχει εφαρμοστεί η διάθεση του κατσιγάρου σε λίμνες εξάτμισης (Κρήτη), σε λάκκους (Χίος) ή στο έδαφος (Κύπρος), μέθοδοι που απαιτούν μεγάλες εκτάσεις για τη διάθεση των αποβλήτων και συχνά δημιουργούν αισθητικά προβλήματα εξαιτίας της κακής διαστασιολόγησης και κατασκευής των συστημάτων αυτών.

Έχει εφαρμοστεί η μετατροπή των ελαιουργείων από τριφασικά σε διφασικά (Ισπανία), διαδικασία που μειώνει σημαντικά τον όγκο του απαιτούμενου νερού στο ελαιουργείο και κατά συνέπεια τον όγκο των παραγόμενων υγρών αποβλήτων, αλλά μεταθέτει την αντιμετώπιση του προβλήματος σε ένα μίγμα πυρήνα-κατσιγάρου.

Παράλληλα, σε πιλοτική κλίμακα έχει δοκιμαστεί η παραγωγή υγρού εδαφοβελτιωτικού (Καλαμάτα) ή κομπόστας από τον κασίγαρο (Κρήτη, Καλαμάτα), διαδικασία που προϋποθέτει την ύπαρξη επαρκούς αγοράς για τη διάθεση του παραγόμενου υλικού.

Επίσης, έχουν εφαρμοστεί η χημική οξείδωση (Κρήτη) και η αναερόβια χώνευση του κατσιγάρου (Κρήτη), τεχνικές με υψηλό λειτουργικό και κατασκευαστικό κόστος, αντίστοιχα. Έχει δοκιμαστεί επίσης, η συνεπεξεργασία του κατσιγάρου με αστικά λύματα σε τεχνητούς υγρότοπους ή σε μονάδες ενεργού ιλύος (Κρήτη), τεχνική που προαπαιτεί σημαντική αραίωση του κατσιγάρου. Τέλος, έχει δοκιμαστεί ο διαχωρισμός του κατσιγάρου σε κλάσματα με τη βοήθεια φυσικής καθίζησης (Σάμος), τεχνική που απαιτεί τον συνδυασμό της με κάποια από τις προαναφερθείσες μεθόδους για να δώσει ικανοποιητικό βαθμό καθαρισμού των αποβλήτων.

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί σε εργαστηριακή κλίμακα **η ανάκτηση των πολυφαινολών από τον κατσίγαρο με χρήση μεμβρανών**, ώστε να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων, αρωμάτων και φαρμάκων. Η εκμετάλλευση των αποβλήτων με την παραπάνω μέθοδο φαίνεται ότι είναι τεχνικά δυνατή.

Οι επιπτώσεις από την διάθεση των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων με την υφιστάμενη μέθοδο των αναχωμάτων (λυματοστασίων), μπορούν να συνοψισθούν για εξοικονόμηση χώρου στην: προκαλούμενη ρύπανση και μόλυνση (εδάφους, επίγειων και υπόγειων υδατικών πόρων και της ατμόσφαιρας), στην αισθητική υποβάθμιση των αποδεκτών, την όχληση από τις εκλυόμενες οσμές και την φυτοτοξικότητα.

Μετά την διεθνή συνάντηση της Σητείας το 1994, όπου υποβλήθηκαν αξιόλογοι μέθοδοι επεξεργασίας κατσίγαρου, εκ των οποίων αρκετές έλυναν οριστικά το περιβαλλοντικό πρόβλημα της διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων και την παντελή αδιαφορία της Πολιτείας να αξιοποιήσει κάποια από αυτές (1η Χαμένη ευκαιρία), αποφασίστηκε από τους συνέδρους χωρίς όμως να κατοχυρωθεί θεσμικά από το ΥΠΕΧΩΔΕ, ή από την Πολιτεία, η διάθεση του κατσίγαρου προσωρινά σε εξατμισιοδεξαμενές (αναχώματα ή λάκκους ή λυματοστάσια).

Η λαϊκή σοφία όμως και εδώ επαληθεύτηκε με την έννοια του «ουδέν μονιμότερο του προσωρινού». Έτσι, ο εφησυχασμός που προέκυψε από την προσωρινή διευθέτηση του προβλήματος, επέφερε την πλήρη αδιαφορία των ερευνητών και της Πολιτείας, με αποτέλεσμα τις οδυνηρές επιπτώσεις στο περιβάλλον και την υγεία των συμπολιτών μας. Ουσιαστικά, η μέθοδος των αναχωμάτων όπως αποδείχτηκε στην πράξη δεν έλυσε κανένα περιβαλλοντικό πρόβλημα, απλά το μετατόπισε.

Με την μέθοδο αυτή, αντί να διατίθεται ο κατσίγαρος στα ρυάκια, τους ποταμούς και την θάλασσα, έφθανε τελικά εκεί ανεπεξέργαστος μέσω των αναχωμάτων. Μια ποσότητα βέβαια κατά τη θερινή περίοδο εξατμιζόταν, δημιουργώντας όμως πολλαπλάσια προβλήματα δυσοσμίας, τα οποία ζούμε και σήμερα. Η μόλυνση δε των υπόγειων και επίγειων νερών, έχει αποδειχθεί από γεωτρήσεις και το δίκτυο ύδρευσης.

1.3.3. Μέθοδοι διαχείρισης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων. (ΥΑΕ).

Μηχανική επεξεργασία.	Βιολογική επεξεργασία.	Φυσικοχημική επεξεργασία.
1) Διήθηση (<i>Filtration</i>).	1) Λίμνες Εξάτμισης (<i>Lagoons</i>).	1) Διαχωρισμός με μεμβράνες. (<i>Membrane separation</i>).
2) Επίπλευση (<i>Flotation</i>).	2) Μέθοδος Ενεργού ιλύος (<i>Activated Sludge</i>). (α) Απομάκρυνση Αμμωνιακού Αζώτου. (β) Απομάκρυνση Φωσφόρου.	2) Αποτέφρωση (<i>Incineration</i>).
3) Καθίζηση (<i>Sedimentation</i>).		
4) Απολίπωση (<i>Degreasing</i>).		

Πίνακας 2. Μέθοδοι Διαχείρισης των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείων.

Πολλοί επιστήμονες εργάζονται πάνω στην εύρεση αποδοτικών, και από άποψη κόστους, εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισης. Για να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός, διάφορες μέθοδοι, αλλά και συνδυασμοί αυτών, έχουν εφαρμοστεί, συμπεριλαμβανομένου χημικών, μηχανικών, φυσικών, βιολογικών και θερμικών μεθόδων.

Κάποιες από τις φυσικοχημικές, χημικές, βιολογικές (αερόβιες ή αναερόβιες) μεθόδους διαχείρισης, φαίνεται να είναι αποδοτικές. Ωφέλιμη χρήση των ΥΑΕ και των τελικών προϊόντων του είναι αναμενόμενη, όπως η ανακύκλωση του νερού που περιέχουν και η χρήση των υπολειμμάτων σαν λίπασμα είτε απευθείας ή μετά από κομποστοποίηση ή σαν ακατέργαστο υλικό για την παραγωγή αντιοξειδωτικών. Τα απόβλητα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σαν καύσιμα είτε με απευθείας καύση είτε μετά την παραγωγή βιοαερίου.

Παρόλο που μία αποδοτική και ταυτόχρονα οικονομική εναλλακτική μέθοδος διαχείρισης ΥΑΕ δεν έχει προταθεί ακόμη, ωστόσο η αποθήκευση

και η εξάτμιση σε λίμνες είναι η πιο κοινή μέθοδος για τη διάθεση των ΥΑΕ.

Σύμφωνα με αυτή την εφαρμογή, τα απόβλητα αποθηκεύονται σε λίμνες κατά τη διάρκεια λειτουργίας του ελαιοτριβείου, η οποία διαρκεί περίπου 3 μήνες, και το υγρό κλάσμα εξατμίζεται στη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της επιλογής είναι η δυσσομία, που προκαλείται από τις εκπομπές πτητικών οργανικών ενώσεων και η ενοχλητική σκνίπα.

1.3.3.1. Μηχανική επεξεργασία.

1) Διήθηση (*Filtration*).

Η διήθηση, είναι μια από τις παλαιότερες μεθόδους για την απομάκρυνση των στερεών από τα υγρά απόβλητα. Τα στερεά περιλαμβάνουν άργιλο και ιλύ, οργανική ουσία, ιζήματα από άλλες επεξεργασίες, σίδηρο, μαγγάνιο και μικροοργανισμούς. Ο διαχωρισμός γίνεται με τη βοήθεια πορώδους υλικού που συγκρατεί τα στερεά και επιτρέπει τη διέλευση της υγρής φάσης. Τα φίλτρα μπορεί να είναι στρώματα άμμου, αμμοχάλικου ή ενεργού άνθρακα που βοηθούν στην αφαίρεση και των πιο μικρών μορίων.

Η διήθηση καθαρίζει το νερό και ενισχύει την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης (Israilides et. al., 1997). Μπορεί να εφαρμοστεί μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλη τεχνολογία επεξεργασίας. Η διήθηση μπορεί να γίνει είτε φυσική (με βαρύτητα), είτε βεβιασμένη, με εφαρμογή πίεσης στην πλευρά εισόδου ή με εφαρμογή κενού στην πλευρά εξόδου των αποβλήτων.

Συνήθως, η διήθηση χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των στερεών υλικών από τα υγρά απόβλητα που μπορεί να εμποδίσουν την περαιτέρω επεξεργασία (πχ φράξιμο σωλήνων). Η διήθηση για την απομάκρυνση των αιωρούμενων στερεών από τα υγρά απόβλητα βασίζεται στις μεθόδους διαχωρισμού μεμβρανών.

2) Επίπλευση (*Flotation*)

Η επίπλευση, είναι μια μηχανική μέθοδος διαχωρισμού των αιωρούμενων στερεών από τα υγρά απόβλητα. Η χρήση ενός αερίου στο σύστημα, όπως αέρα ή αζώτου, διευκολύνει το διαχωρισμό. Η αρχή της μεθόδου είναι απλή. Το αέριο διοχετεύεται υπό πίεση στα απόβλητα σχηματίζοντας λεπτές φυσαλίδες και προσροφάται στην επιφάνεια των

στερεών, μειώνοντας το ειδικό βάρος και διευκολύνοντας το διαχωρισμό.

Για τη διευκόλυνση της διαδικασίας χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες όπως:

I. Ουσίες που προκαλούν αφρισμό (*foaming chemicals*). Η δημιουργία αφρού σταθεροποιεί τις φυσαλίδες και τον αφρό στην επιφάνεια της δεξαμενής. Σε διαφορετική περίπτωση, εάν σταματήσει ο σχηματισμός φυσαλίδων και αφρού, τα αιωρούμενα στερεά θα κατακρημνιστούν.

II. Ουσίες που καθιστούν τα αιωρούμενα στερεά υδρόφοβα. Με τη χρήση των ουσιών αυτών, τα αιωρούμενα στερεά προσκολλώνται ευκολότερα στις φυσαλίδες του αέρα και κινούνται προς την επιφάνεια. Αυτοί οι χημικοί παράγοντες καλούνται επίσης συλλέκτες (*collectors*).

III. Μερικοί ρυθμιστικοί παράγοντες όπως ρυθμιστές pH, ουσίες που προκαλούν κροκίδωση, κλπ.

Εφαρμόζονται διάφοροι τύποι επίπλευσης, οι όποιοι διαφέρουν κυρίως στον τρόπο που παράγονται οι φυσαλίδες. Η επίπλευση με διαλυμένο αέρα (*dissolved air flotation*), είναι η ευρύτερη μέθοδος που εφαρμόζεται λόγω της αποτελεσματικότητας στην απομάκρυνση μεγάλου εύρους στερεών. Μέχρι τώρα, η επίπλευση χρησιμοποιούνταν μόνο σε πειραματικό στάδιο για την επεξεργασία των αποβλήτων των ελαιοτριβείων. Η επίπλευση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αφαίρεση της πολύ λεπτής φάσης ελαίου (γαλάκτωμα) στα απόβλητα, αλλά η εφαρμογή παραμένει οριακή λόγω της χαμηλής αναλογίας δαπάνη/όφελος.

Είναι δυνατό να αφαιρεθεί η λιγνίνη και πολυμερή της λιγνίνης από τα υγρά απόβλητα με διήθηση. Τα συστατικά αυτά μπορεί να διασπαστούν στη συνέχεια από κάποιους μύκητες π.χ. *actinobacteria*, που χρησιμοποιούν την λιγνίνη ως θρεπτικό υπόστρωμα.

3) Καθίζηση (Sedimentation)

Η καθίζηση στηρίζεται στη μεγαλύτερη πυκνότητα των μορίων από αυτή του νερού για την απομάκρυνσή τους από την υδατική φάση. Η διαδικασία μπορεί να είναι φυσική (κατακρήμνιση λόγω βαρύτητας) ή εξαναγκασμένη (σε φυγοκεντρικό διαχωριστή ή κυκλώνα). Μετά από την αφαίρεση των ογκωδών στερεών, ταυγρά απόβλητα ρέουν στις δεξαμενές καθίζησης, όπου η ταχύτητα ροής μειώνεται και τα αιωρούμενα υλικά βυθίζονται στον πυθμένα της δεξαμενής. Σε αυτό το στάδιο απομακρύνεται το 50% περίπου των

διαλυμένων στερεών και το 35% του BOD.

Επίσης, τα συστατικά που επιπλέουν όπως το έλαιο συλλέγονται από την επιφάνεια των δεξαμενών. Το υλικό που καθιζάνει (ιλύς), συλλέγεται σε μια χοάνη και οδηγείται για περαιτέρω επεξεργασία. Μερικές φορές χρησιμοποιείται ασβέστης για τον έλεγχο των ανεπιθύμητων οσμών. Από μελέτη που έχει γίνει (Komilis et al., 2005) φάνηκε ότι ο χρόνος που απαιτείται για να σταθεροποιηθεί η συγκέντρωση των TSS (*total suspended solids*-ολικά αιωρούμενα στερεά- mg/L), είναι ίσος με 5 ημέρες. Είναι, λοιπόν, σημαντικό να γνωρίζουμε ότι απαιτείται η κατασκευή μεγάλων δεξαμενών, ώστε να είναι εφικτή η επίτευξη του χρόνου παραμονής των 5 ημερών.

4) Απολίπωση (Degreasing)

Πριν την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων στο σύστημα βιολογικού καθαρισμού, θα πρέπει πρώτα να απομακρυνθεί η λιπαρή φάση με τη χρήση παγίδας λιπών, δεδομένου ότι εμποδίζουν την ομαλή λειτουργία των βιολογικών εγκαταστάσεων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Παράγοντας αποφασιστικής σημασίας για την επιλογή του κατάλληλου

συστήματος απολίπωσης είναι το μέγεθος των ελαιοσταγονιδίων. Όσο μεγαλύτερα είναι τα σταγονίδια, τόσο μεγαλύτερη είναι η τάση τους να σχηματίσουν ένα φιλμ ελαίου στην επιφάνεια του νερού, για την απομάκρυνση του οποίου χρησιμοποιούνται ειδικές συσκευές, οι απολιπωτές (*oil skimmer*).

Οι συσκευές αυτές είναι ιμάντες ή δίσκοι από χάλυβα ή πλαστικό που βυθίζονται συνεχώς στα υγρά απόβλητα. Το έλαιο προσκολλάται στην υδρόφιλη φάση και στη συνέχεια απομακρύνεται από την επιφάνεια. Στην περίπτωση που τα σταγονίδια του ελαίου είναι πολύ μικρά ή η συγκέντρωση του ελαίου είναι χαμηλή, χρησιμοποιούνται οι φυγοκεντρικοί διαχωριστές ή διαχωριστές βαρύτητας.

1.3.3.2. Βιολογική επεξεργασία.

1) Λίμνες Εξάτμισης (Lagoons)

Οι λίμνες εξάτμισης είναι μία από τις παλαιότερες μεθόδους για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων. Αποτελεί ικανοποιητική τεχνική για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων με μικρό ρυπαντικό φορτίο. Οι βιολογικές μέθοδοι επεξεργασίας βασίζονται στη δράση μικροοργανισμών που αποικοδομούν τα οργανικά συστατικά, των αποβλήτων σε απλούστερα,

αβλαβή και ενεργειακά σταθερότερα προϊόντα. Το κύριο μειονέκτημα των λιμνών εξάτμισης είναι οι μεγάλες επιφάνειες που απαιτούνται και η μεγάλη περίοδος επεξεργασίας που διαρκεί περισσότερο από 60 ημέρες.

Σήμερα οι λίμνες εξάτμισης χρησιμοποιούνται για "αποθήκευση" και εξάτμιση του ύδατος, ενώ παράλληλα έχουμε και διαχωρισμό των στερεών από την υγρή φάση με καθίζηση. Το μέγιστο ποσοστό εξάτμισης μπορεί να φθάσει σε τιμές 1m^3 ανά 1m^2 κατά τη διάρκεια ενός μήνα. Μετά την εξάτμιση των υγρών αποβλήτων, τα στερεά που απομένουν χρησιμοποιούνται ως λίπασμα. (Rozzi et al., 1996).

Οι λίμνες εξάτμισης είναι απλές εφαρμογές, χαμηλού κόστους, αλλά υπάρχει κίνδυνος ρύπανσης του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα εάν η μόνωση της λεκάνης δεν είναι σωστή ή εάν υπάρξει κάποια διαρροή. Κύριο μειονέκτημα, της μεθόδου είναι η έντονη δυσσομία που αναδύεται από τα υγρά απόβλητα, η οποία είναι αντιληπτή σε μεγάλη απόσταση. Ο ρυθμός εξάτμισης εξαρτάται από το κλίμα και μπορεί να διαρκέσει μερικές εβδομάδες. Στο τέλος της διαδικασίας παραμένει μια ελαιούχος και υγρή λάσπη. (Rozzi et al., 1996).

2) Μέθοδος Ενεργού ιλύος (Activated Sludge).

Οι πρώτες εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων δημιουργήθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1930. Κύριος σκοπός τότε ήταν η απομάκρυνση των μη διαλυτών στερεών (π.χ. άμμος, περιττώματα). Τα διαλυμένα συστατικά (οργανικές ενώσεις, άζωτο, και φωσφόρος) απορρίπτονταν στα ποτάμια. Τα αποτελέσματα ήταν τοξικά και δημιούργησαν συνθήκες ευτροφισμού στους υδατικούς αποδέκτες. Η πρώτη βιολογική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων επικεντρώθηκε στην αποικοδόμηση των οργανικών πηγών άνθρακα. Σήμερα, η κατάσταση έχει αλλάξει ριζικά και τα πρότυπα ποιότητας στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων είναι πολύ υψηλά. Η μέθοδος εστιάζεται στη βιολογική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων, λόγω της χαμηλότερης λειτουργικής δαπάνης και της υψηλότερης αποδοτικότητας σε σύγκριση με τη χημική επεξεργασία. Η μέθοδος της ενεργούς ιλύος είναι η περισσότερο διαδεδομένη βιολογική επεξεργασία υγρών αποβλήτων στον κόσμο. (Hey, T., et al., 2012). Η βιομάζα αποτελείται από βακτήρια, που είναι υπεύθυνα για τη

διαδικασία αποικοδόμησης και πρωτόζωα που τρώνε τα βακτήρια. Η διαδικασία αυτή της βιοκένωσης (biocenosis) καλείται ενεργή υλής.

Η διαδικασία αποικοδόμησης οδηγεί στην παραγωγή υψηλών ποσοτήτων ιλύος, διοξείδιο του άνθρακα και νιτρικά ιόντα (NO_3^-). Η ιλύς ανακυκλώνεται μερικώς στη δεξαμενή αερισμού και το πλεόνασμα θα πρέπει να υποβληθεί σε κάποια επεξεργασία, πριν διατεθεί για περαιτέρω χρήση. Βελτιώσεις στην επεξεργασία των αποβλήτων οδήγησαν στην τροποποίηση της μεθόδου από μια δεξαμενή αερόβιας επεξεργασίας, σε ένα συνδυασμό δεξαμενών που περιλαμβάνουν αερόβιες, ανοξικές (anoxic, δηλ. Συνθήκες όπου το διαλυμένο οξυγόνο είναι μεταξύ 0-0,5 ppm) και αναερόβιες συνθήκες, οι οποίες απομακρύνουν ανόργανα στοιχεία όπως το άζωτο και ο φωσφόρος. Για να γίνουν κατανοητές αυτές οι διαδικασίες, θα πρέπει να αναφερθούν σύντομα μερικά βασικά στοιχεία.

(α) Απομάκρυνση Αμμωνιακού Αζώτου.

Οι αζωτούχες ενώσεις όπως η αμμωνία, τα νιτρώδη και νιτρικά άλατα προκαλούν το φαινόμενο του ευτροφισμού και είναι επικίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία. Η απομάκρυνση του αζώτου από τα υγρά απόβλητα χωρίζεται σε δύο φάσεις : **Νιτροποίηση** (nitrification) και **Απονιτροποίηση** (denitrification). Αυτό οδηγεί στην οξείδωση της οργανικής ουσίας καθώς επίσης και στην αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και τέλος σε οξείδια του αζώτου και αέριο άζωτο.

Η Νιτροποίηση, πραγματοποιείται σε έντονα οξειδωτικές συνθήκες και περιλαμβάνει δύο στάδια:

1. Μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων σε νιτρώδη με τη δράση νιτροβακτηρίων του γένους *Nitrosomonas*: $\text{NH}_4^+ + 1,5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$
2. Μετατροπή των νιτρωδών ιόντων σε νιτρικά με τη δράση νιτροβακτηρίων του γένους *Nitrobacter* $\text{NO}_2^- + 0,5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$.

Η Απονιτροποίηση, είναι το δεύτερο στάδιο στην απομάκρυνση του αζώτου από τα υγρά απόβλητα, κατά το οποίο οι μικροοργανισμοί προσλαμβάνουν την απαραίτητη ενέργεια για την αναπαραγωγή τους από την αναγωγή των νιτρικών σε αέριο άζωτο. Για την αναγωγή των νιτρικών σε άζωτο απαιτείται οπωσδήποτε μία πηγή άνθρακα που μπορεί να προέρχεται από τις διαλυτές οργανικές ενώσεις των ακατέργαστων αποβλήτων. Η

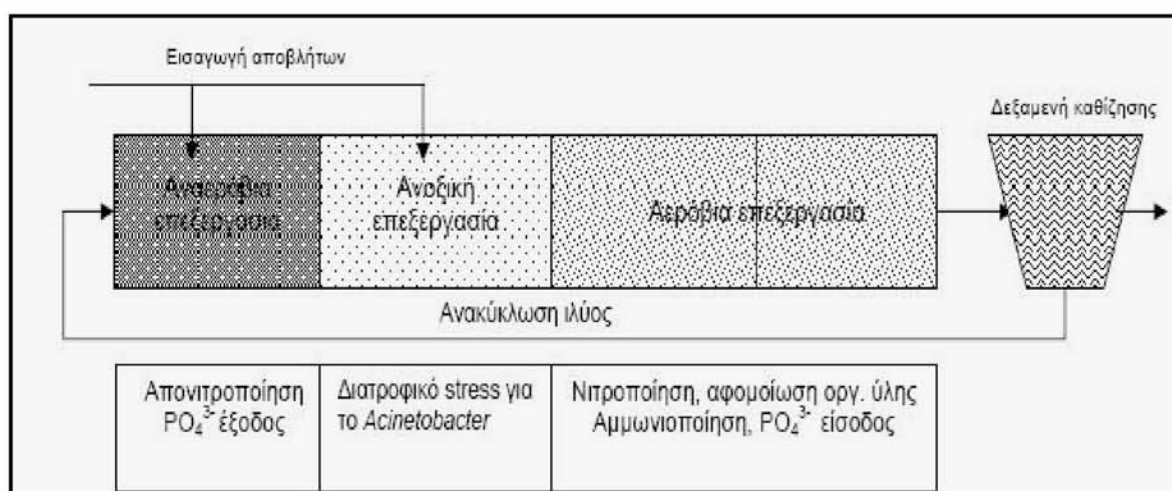
ακόλουθη σχέση παρουσιάζει αυτήν τη διαδικασία: $2\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 10[\text{H}] \rightarrow \text{N}_2\uparrow + 6\text{H}_2\text{O}$.

(β) Απομάκρυνση Φωσφόρου.

Ο φωσφόρος είναι σε μεγαλύτερο βαθμό υπεύθυνος για τη δημιουργία συνθηκών ευτροφισμού, συγκριτικά με το άζωτο, προκαλώντας σημαντική αύξηση στην πληθυσμιακή πυκνότητα των αλγών. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση του διαλυμένου οξυγόνου στους υδατικούς αποδέκτες και η θανάτωση των υδρόβιων οργανισμών. Κατά τη βιολογική επεξεργασία των αποβλήτων, ένα μέρος του στοιχείου αυτού ενσωματώνεται στη κυτταρική βιομάζα, ως απαραίτητο συστατικό της δομής της, ενώ η περίσσεια, μπορεί να απομακρυνθεί, είτε με βιολογική διεργασία, είτε με χημική καθίζηση.

Σήμερα, συμβαίνει συχνά να απομακρύνεται ο φωσφόρος από τα υγρά απόβλητα με χημική διεργασία (καθίζηση), χρησιμοποιώντας χημικά πρόσθετα $\text{Ca}(\text{OH})_2$ και FeCl_3 . Ο φωσφόρος, καταβυθίζεται είτε ως άλας ασβεστίου ή ως άλας σιδήρου. Ταιζήματα, παραλαμβάνονται είτε στην πρωτογενή είτε στη δευτερογενή λάσπη.

Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι το αυξημένο κόστος, λόγω της χημικής επεξεργασίας, ενώ παράλληλα παράγονται υψηλά ποσά κατακρημνισμένης λάσπης, η οποία πρέπει να απορριφθεί. (Lemmer, H. 1996).



Γράφημα 3: Διάγραμμα Ροής με Μερικές Σημαντικές Λειτουργίες στην Επεξεργασία των Υγρών Αποβλήτων.

Γενική περιγραφή της μεθόδου.

Η μέθοδος της ενεργούς ιλύος περιλαμβάνει τη χρήση διαφορετικών μικροοργανισμών όπως βακτήρια, νηματοειδή βακτήρια, πλεντάζα ή τριχόποδα (*rotifers*), πρωτόζωα και φύκη (*algae*). Είναι σημαντικό κατά τη διαδικασία της ενεργούς ιλύος η υπάρχουσα μικροχλωρίδα να σχηματίζει συσσωματώματα, τα οποία καθιζάνουν εύκολα, δημιουργώντας διαυγή απόβλητα με χαμηλή συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών. (Srinandan, C.S., et al., 2011). Για την επιτυχία της μεθόδου είναι επίσης σημαντικό να γνωρίζουμε τους τύπους βακτηρίων και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους.

Πρόσφατα, βιο-αντιδραστήρες μεμβρανών (MBRs), με εξωτερική ή εσωτερική μονάδα μικρο-διήθησης (microfiltration) και υπερδιήθησης (ultrafiltration), αρχίζουν να αποτελούν ελπιδοφόρα εναλλακτική λύση στα συμβατικά συστήματα της ενεργούς ιλύος. Τα συστήματα αυτά είναι συμπαγή (αποφεύγοντας την καθίζηση), υψηλής απόδοσης (με συγκεντρώσεις λάσπης 2-3 φορές μεγαλύτερες από τα συμβατικά συστήματα) και ικανά για επεξεργασία υγρών αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων με υψηλό COD.

1.3.3.3. Φυσικοχημική επεξεργασία.

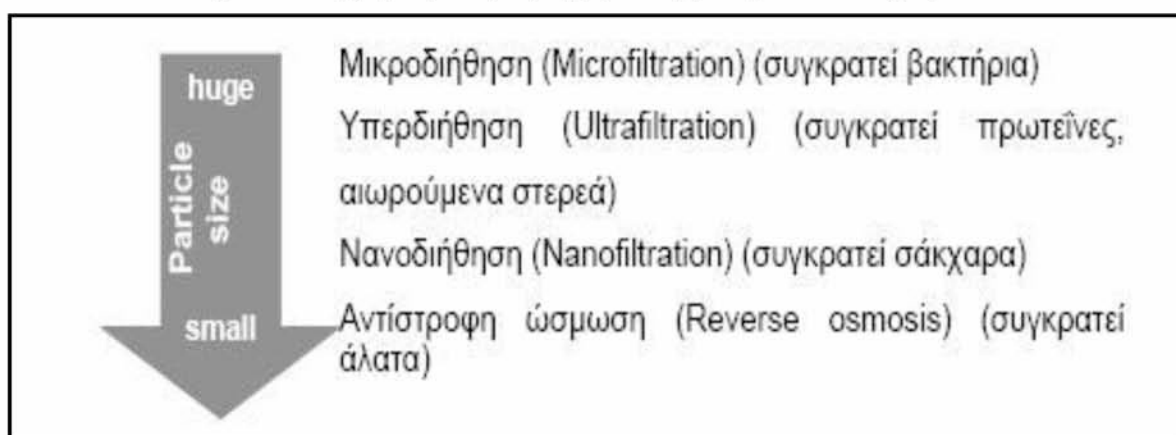
Η αποτελεσματική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων περιλαμβάνει την κατάλληλη προ-επεξεργασία με μεθόδους όπως η διήθηση, η συσσωμάτωση (*flocculation*) και το φιλτράρισμα. Με την επιλογή του καλύτερου χημικού παράγοντα (πολυηλεκτρολύτη) για συσσωμάτωση, είναι δυνατόν να αποβληθεί σημαντικό ποσοστό κολλοειδών σωματιδίων από τα υγρά απόβλητα, τα οποία θα αφαιρεθούν στη συνέχεια με ένα φίλτρο άμμου (*sandbed*). Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει διήθηση μέσω μεμβρανών που εξασφαλίζει συνολική μείωση του οργανικού φορτίου κατά **95%**.

1) Διαχωρισμός με μεμβράνες (*Membrane separation*).

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για την απομάκρυνση αιωρούμενων, κολλοειδών και διαλυμένων ουσιών από τα υγρά απόβλητα. Χρησιμοποιείται μία ημιπερατή ή πορώδης μεμβράνη, η οποία λειτουργεί σαν φυσικό φράγμα μέσω του οποίου οι ουσίες είτε περνούν είτε παρακρατούνται ανάλογα με το μέγεθός τους. Η δομή και τα χαρακτηριστικά της μεμβράνης καθορίζουν τη

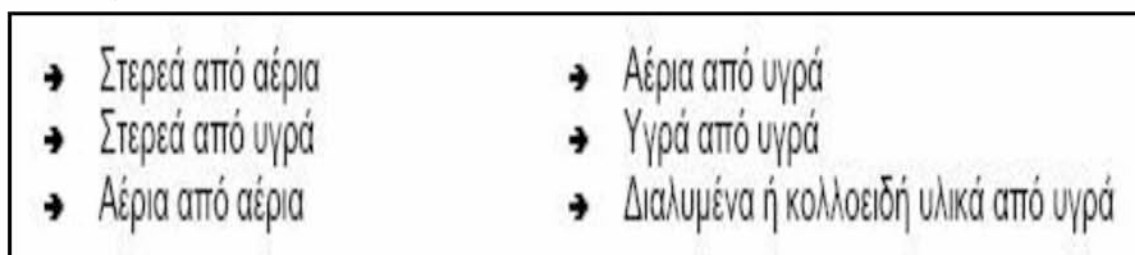
φύση του διαχωρισμού. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των διαδικασιών διήθησης με μεμβράνες είναι η εφαρμογή πίεσης, η οποία αναγκάζει το διάλυμα να περάσει μέσω της πορώδους μεμβράνης και να επιτευχθεί εκλεκτικός διαχωρισμός. Η διαπερατότητα εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων και των πόρων των μεμβρανών.

Τα συστήματα διαχωρισμού με μεμβράνες μπορεί να διαχωρίσουν τα:



Η τεχνολογία των μεμβρανών χρησιμοποιείται για τη συγκέντρωση (*concentration*), τον καθαρισμό (*purification*) και την κλασματοποίηση (*fractionation*) και είναι αποτελεσματική για την ανάκτηση και την επαναχρησιμοποίηση των πρώτων υλών, προϊόντων και νερού. Εφαρμόζεται για τη συγκέντρωση των υγρών, στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων.

Γενικά, ο διαχωρισμός με μεμβράνες διακρίνεται ανάλογα με το μέγεθος των πόρων σε:



Πριν το διαχωρισμό με μεμβράνες είναι απαραίτητο ένα στάδιο προ-φιλτραρίσματος ώστε να αφαιρεθούν τα μεγάλα αιωρούμενα στερεά.

Έχει υποστηριχτεί ότι η τεχνολογία των μεμβρανών επιτρέπει το διαχωρισμό ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας από τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων π.χ. πολυφαινόλες, (Rozzi et al., 1996), αλλά μέχρι σήμερα

δεν υπάρχει καμία μονάδα που να αξιοποιεί τα υγρά απόβλητα προς την κατεύθυνση αυτή. Ο διαχωρισμός με μεμβράνες δεν είναι κατάλληλος για υγρά απόβλητα υψηλού ρυπαντικού φορτίου από την παραγωγή ελαιολάδου, γιατί δημιουργούν προβλήματα στην ομαλή λειτουργία των μεμβρανών, λόγω φραξίματος των πόρων και φαινομένων συσσωμάτωσης και προσρόφησης, γεγονός που συμβάλλει στη δημιουργία ενός στρώματος γλοιώδους υφής στην επιφάνεια των μεμβρανών.

Τα λιπαρά οξέα, που βρίσκονται στα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων, μπορούν επίσης να μειώσουν την απόδοση του συστήματος των μεμβρανών. Τα λιπαρά οξέα μπορούν να φράξουν τους πόρους και να μειώσουν τη ροή διαμέσου των μεμβρανών, λόγω της ικανότητάς τους να προσροφώνται στις υδρόφοβες επιφάνειες, όπως αυτές των μεμβρανών (Rozzi et al., 1996).

Η τεχνολογία των μεμβρανών είναι αποτελεσματική στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων, μόνον όταν το υψηλό ρυπαντικό φορτίο έχει μειωθεί προηγουμένως με άλλες μηχανικές ή βιολογικές μεθόδους. (Brenes et al., 1993).

Ένα αποτελεσματικό σύστημα διήθησης που χρησιμοποιεί μεμβράνη είναι η νανοδιήθηση (nanofiltration). Η νανοδιήθηση είναι μια μέθοδος φιλτραρίσματος που χρησιμοποιεί μεμβράνες για να διαχωρίσει διαφορετικά ρευστά ή ιόντα. Δεν είναι τόσο αποτελεσματική μέθοδος όπως η αντίστροφη όσμωση, αλλά απαιτεί λιγότερη ενέργεια για να εκτελέσει το διαχωρισμό. Η νανοδιήθηση είναι αποτελεσματική για το διαχωρισμό σακχάρων, δισθενών αλάτων, βακτηρίων, πρωτεϊνών, σωματιδίων, χρωστικών ουσιών και άλλων συστατικών που έχουν μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 1.000 Da.

Η νανοδιήθηση και η αντίστροφη όσμωση επηρεάζονται από το φορτίο των προς επεξεργασία σωματιδίων. Έτσι, σωματίδια με μεγαλύτερο φορτίο είναι πιθανότερο να απορριφθούν. Η μέθοδος της διήθησης δεν είναι αποτελεσματική για οργανικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους, όπως η μεθανόλη.

Συστατικό	Είσοδος	Έξοδος	Απόρριψη [%]
Βακτήρια [No/mL]	108	0	100
Αιωρούμενα στερεά [mg/L]	1.090	0	100
COD [mg/L]	8.950	705	92
BOD ₅ [mg/L]	5.970	500	92
Έλαιο/λίπος [mg/L]	150	0	100
Διαλυτά στερεά [mg/L]	150	0	100

Πίνακας 3: Συστατικά Απόρριψης.

Ο συνδυασμός συστήματος νανοδιήθησης με εξατμιστή «κύματος» (*flash evaporator*), μειώνει τον όγκο των υγρών αποβλήτων κατά 75%. (Watanabe, K., et.al., 1995). Η υγρή φάση που εξέρχεται από το σύστημα επαναχρησιμοποιείται στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας για να μειώσει τη δαπάνη του χρησιμοποιούμενου ύδατος. Μερικές πειραματικές εγκαταστάσεις διαχωρίζουν τα λιπαρά οξέα από τα υγρά απόβλητα με υπερδιήθηση. Το σύστημα ανακτά περίπου 900 kg λιπαρά οξέα / ημέρα με δαπάνη περίπου 1,13 US\$ / kg ανακτημένου προϊόντος. Σύμφωνα με μελέτες (Brenes et. al., 1993 & Paraskeva et.al. 2007), προκύπτει ότι η επεξεργασία των ΥΑΕ με τη χρήση μεμβρανών εξασφαλίζει την διάθεση του τελικού προϊόντος στο περιβάλλον. Το τελικό προϊόν μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για άρδευση ή να ανακυκλωθεί και να χρησιμοποιηθεί στο ελαιοτριβείο για την κάλυψη αναγκών.

Επιπλέον, η ανάμειξη των στερεών, που προκύπτουν στα διάφορα στάδια της διεργασίας, με άλλα υλικά μπορεί να οδηγήσει στη χρήση τους σαν εδαφοβελτιωτικό. Βασικό μειονέκτημα της διεργασίας αποτελεί το γεγονός ότι είναι απαραίτητη η υπερδιήθηση για την περαιτέρω επεξεργασία του αποβλήτου, κάτι που αυξάνει το κόστος της διεργασίας.

2) Αποτέφρωση (Incineration).

Η αποτέφρωση είναι η καταστροφή του οργανικού περιεχομένου των αποβλήτων. Παρουσία αέρα σε υψηλή θερμοκρασία, που συνοδεύεται από πλήρη εξάτμιση του ύδατος.

Η επεξεργασία αυτή είναι αποτελεσματική για τα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε οργανική ουσία.

Όσο υψηλότερο είναι το οργανικό περιεχόμενο των υγρών αποβλήτων (οργανική ουσία τουλάχιστον 10%), τόσο αποτελεσματικότερη είναι η τεχνολογία αποτέφρωσης σε σύγκριση με τη μηχανική-βιολογική επεξεργασία.

Ο φούρνος ρευστοποιημένης κλίνης (fluid bed oven) ή οι θάλαμοι στατικής αποτέφρωσης (static incineration chambers), χρησιμοποιούνται γενικά για αποτέφρωση των υγρών αποβλήτων, ενώ οι θάλαμοι αποτέφρωσης με περιστροφικούς σωλήνες (rotary tube ovens), χρησιμοποιούνται για συνδυασμένη αποτέφρωση στερεών και υγρών αποβλήτων.

Τα υγρά απόβλητα ψεκάζονται στο θάλαμο αποτέφρωσης υπό μορφή λεπτών σταγονιδίων μέσω ειδικών ακροφυσίων, επιτυγχάνοντας έτσι την καλύτερη ανάμιξη με τον θερμό αέρα. Η θερμοκρασία αποτέφρωσης κυμαίνεται από 650°C μέχρι 1600°C περίπου. Το ιξώδες των υγρών αποβλήτων είναι εξαιρετικής σημασίας, επειδή ενεργεί ως υπόστρωμα (*feed*) και θα πρέπει να είναι μικρότερο από 10.000 SSU (*Saybolt Universal Seconds*) = Είναι ο χρόνος που 60 cm³ υγρού αποβλήτου (στην περίπτωση μας), χρειάζεται για να ρέει μέσα από ένα βαθμονομημένο σωλήνα σε ελεγχόμενη θερμοκρασία.

Ως μέτρο σύγκρισης αναφέρουμε ότι ιξώδες 10.000 SSU αντιστοιχεί στο ιξώδες του μελιού, ενώ τα φυτικά έλαια έχουν ιξώδες 200 SSU περίπου.

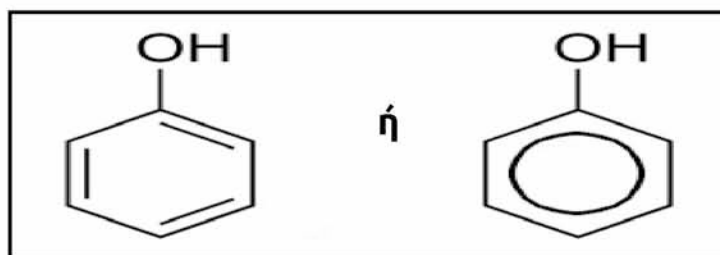
1.4. Το Φαινολικό Περιεχόμενο των Αποβλήτων του Ελαιοτριβείου.

1.4.1. Πολυφαινόλες.

1.4.1.1. Ορισμός.

Πολυφαινόλες – (Polyphenols). Είναι μία τάξη φυσικών, συνθετικών και ημισυνθετικών οργανικών χημικών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών φαινολικών δομών. Ο όρος Πολυφαινόλη, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1894.

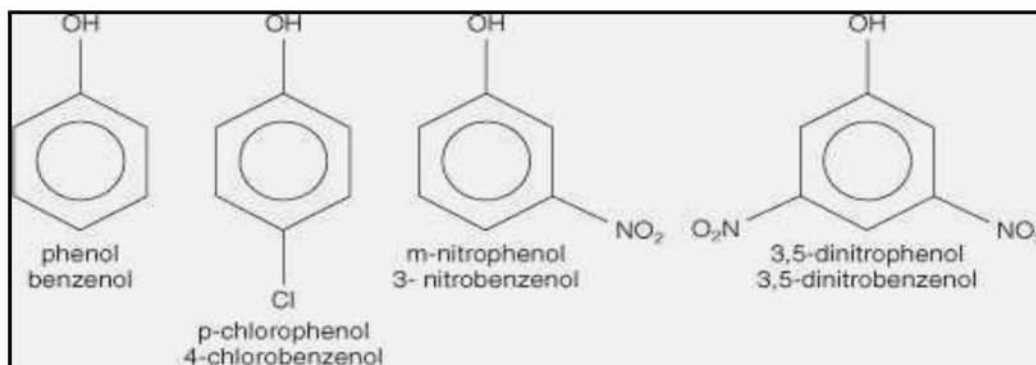
Σύνθετο ουσιαστικό, που σχηματίζεται από την λέξη (πολύ) και την λέξη (φαινόλη), η οποία αναφέρεται σε μία χημική δομή ενός βενζοϊκού δακτυλίου (αρωματικός υδρογονάνθρακας) και μίας υδροξυλικής ομάδας (-OH), που βρίσκονται σε δεσμό μεταξύ των. Είναι δηλαδή, μόρια όπου έχουν μία υδροξυλική ομάδα, σε δεσμό με το άτομο του άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 7. Φαινολικό (Φαινικό οξύ): Η απλούστερη φαινόλη.

1.4.1.2. Ονοματολογία.

Εξ ορισμού, φαινόλη είναι υδροξυβενζόλη. Κατά IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), αποδίδεται η ονοματολογία *benzenol*. Από εκεί και πέρα, με αρχή την υδροξυλική ομάδα, δίδεται δεξιόστοφα και η ονοματολογία..



Εικόνα 8. Ονοματολογία - Κοινό Όνομα και Ονοματολογία κατά IUPAC.

1.4.1.3 . Φυσικές Ιδιότητες.

Είναι χαμηλού μοριακού βάρους. Συνήθως σε υγρή μορφή ή σε στερεή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού, από τις αλκοόλες ιδίου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυροτέρου δεσμού υδρογόνου που έχουν.

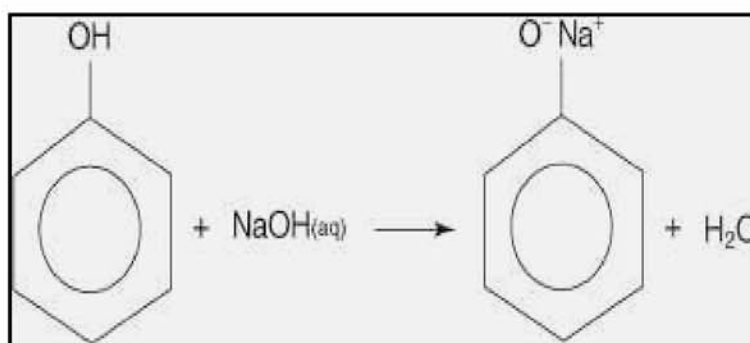
1.4.1.4. Οξύτητα.

Εμφανίζουν **υψηλή** οξύτητα ($pK_a = -\log_{10}K_a = 8^{-10}$). Όπου $K_a = [A^-][H^+] / [HA]$. HA = το αρχικό οξύ που διασπάται σε A^- (συζευγμένη βάση του οξέως) και σε ένα (υδρογονιόν ή πρωτόνιο) H^+ .

Το pK_a μας βοηθά να κατανοούμε την φύση ενός οξέως ή μιας βάσης σαν το pH :

- $pK_a < 2$ --strong acid.
- $pK_a > 2$ but < 7 -- weak acid.
- $pK_a > 7$ but < 10 -- weak base.
- $pK_a > 10$ --strong base.

Για παράδειγμα η φαινόλη αντιδρά με το υδροξείδιο του νατρίου ($NaOH$) που είναι μία ισχυρή βάση, ως ακολούθως:



Εικόνα 9. Μία Τυπική Αντίδραση Εξουδετέρωσης.

Λόγω της υψηλής οξύτητας, οι φαινόλες συχνά ονομάζονται και καρβολικά οξέα (*carbolic acids*). Το μόριο της φαινόλης έχει υψηλή οξύτητα, διότι έχει μερικώς θετικό φορτίο στο άτομο του οξυγόνου, λόγω συντονισμού και το ανιόν το οποίο σχηματίζεται από την απώλεια ενός υδρογόνου, σταθεροποιείται και αυτό με το συντονισμό.

1.4.2. Φυτικές Πολυφαινόλες - Κατηγορίες.

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά (Bravo, 1998). Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων στα ανώτερα φυτά, και ιδιαίτερα σε εδώδιμα φυτά, τα προϊόντα των οποίων αποτελούν τρόφιμα της καθημερινής διατροφής.

Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών, οφείλεται στα φυτοχημικά τους συστατικά:

- Τα φυτοχημικά συστατικά είναι μη θρεπτικά συστατικά που έχουν σημαντική βιολογική δράση.
- Δρουν ως αντιοξειδωτικά και έχουν δράση παρόμοια με αυτή των ορμονών.
- Συνήθως, δρουν συνεργικά, δηλαδή εμφανίζουν ισχυρότερη δράση όταν συνδυάζονται διαφορετικές κατηγορίες φυτοχημικών.
- Παίζουν ρόλο στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, των χρωμάτων και άλλων χαρακτηριστικών των φυτικών τροφών.

Φρούτα, λαχανικά καθώς και ροφήματα όπως το κόκκινο κρασί, ο καφές και το τσάι, αποτελούν καλές πηγές πολυφαινολών. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, που οφείλεται κυρίως στην αναγνώριση των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων καθώς και της πιθανής χημειοπροστατευτικής τους επίδρασης στην ανθρώπινη υγεία (Dew et. al., 2005).

Οι φυτικές πολυφαινόλες, ποικίλουν για κάθε είδος φυτού και στα διάφορα μέρη του. Οι ταννίνες, οι λιγνίνες και τα φλαβονοειδή είναι υποκατηγορίες των πολυφαινολών.

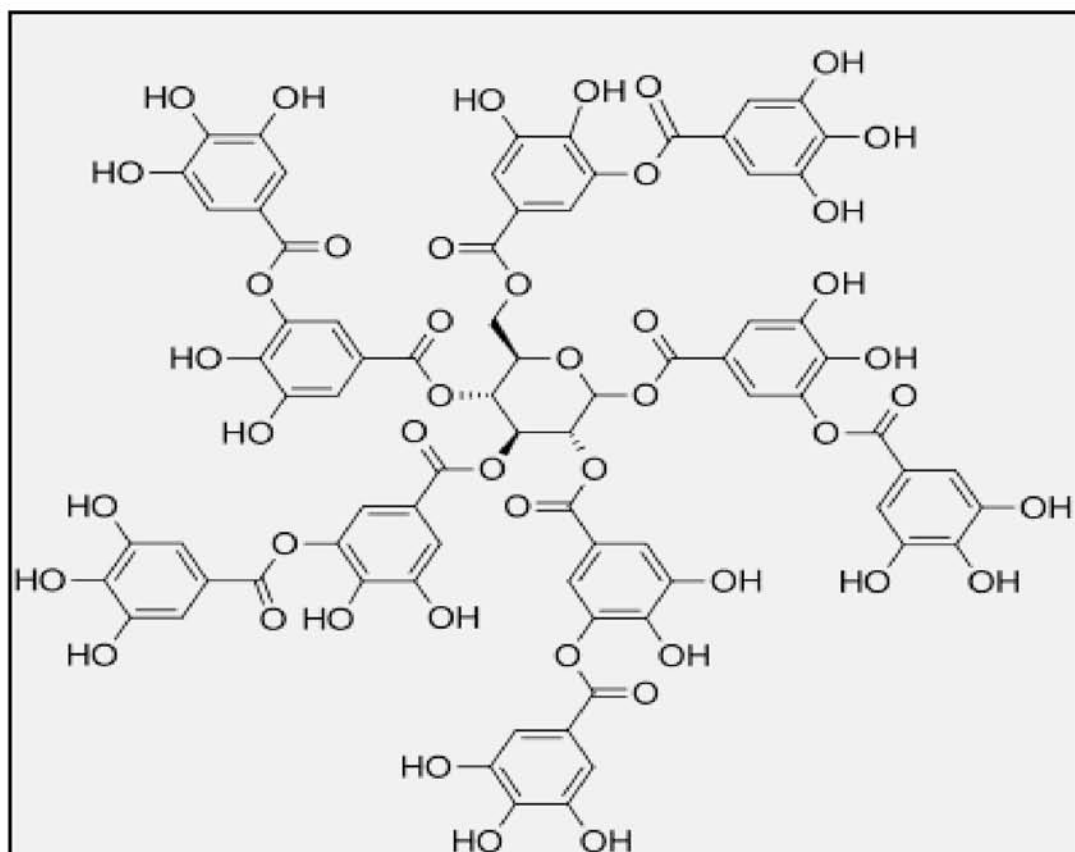
α/α	Κατηγορία	Υποκατηγορία	Χημικοί Τύποι
1	Φλαβονοειδή	Φλαβονόλες	
		Φλαβανόλες	
		Ανθοκυανιδίνες	
2	Πολυφαινολικά οξέα	Υδροξυβενζοϊκό οξύ	
		Υδροξυκινναμικό οξύ	
3	Στιλβένια	<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη	

Πίνακας 4. Φυτικές Πολυφαινόλες.

1.4.3. Όρος WBSSH.

Ο πλέον χημικά αναγνωρισμένος ορισμός του όρου πολυφαινόλη (Haslam, E.; Cai, Y. 1994), δίδεται από τους White–Bate-Smith–Swain–Haslam και αναφέρεται ως όρος (WBSSH), που περιγράφει τις πολυφαινόλες ως:

- Γενικά μέτρια υδατοδιαλυτές ενώσεις.
- Μοριακό βάρος 500–4000 Da.
- >12 υδροξυλικές ομάδες.
- Με 5–7 αρωματικούς δακτυλίους ανά 1000 Da.



Εικόνα 10. Φυτικής Προέλευσης Πολυφαινόλη, Ταννικό Οξύ. $C_{76}H_{52}O_{46}$.

1.4.4. Πολυφαινόλες στα Υγρά Απόβλητα Ελαιολιβερίου.

1.4.4.1. Γενικά.

Η τοξικότητα και η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των αποβλήτων, αφορά στη συγκέντρωση των φαινολών, συστατικά που προκαλούν δύσκολη αποικοδόμηση (Mekki A. et.al., 2007).

1.4.2.2. Φαινολικά Συστατικά στο Ελαιόλαδο.

Στο ελαιόδεντρο υπάρχουν στα φύλλα και στον ελαιόκαρπο. Η συγκέντρωσή τους στο ελαιόλαδο επηρεάζεται από:

- την ωριμότητα του ελαιόκαρπου,
- τον τρόπο και τον χρόνο αποθήκευσης,
- τον τύπο ελαιολιβερίου,
- τις κλιματολογικές συνθήκες κάθε περιοχής. (Ryan, D and Robards K. 1998).

Στο λάδι και στα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν, χαρακτηρίζονται ως πολυφαινόλες. Αυτός ο όρος έχει καθιερωθεί, χωρίς να σημαίνει ότι όλες οι φαινόλες είναι αρωματικοί υδρογονάνθρακες με περισσότερες από 2 υδροξυλομάδες.

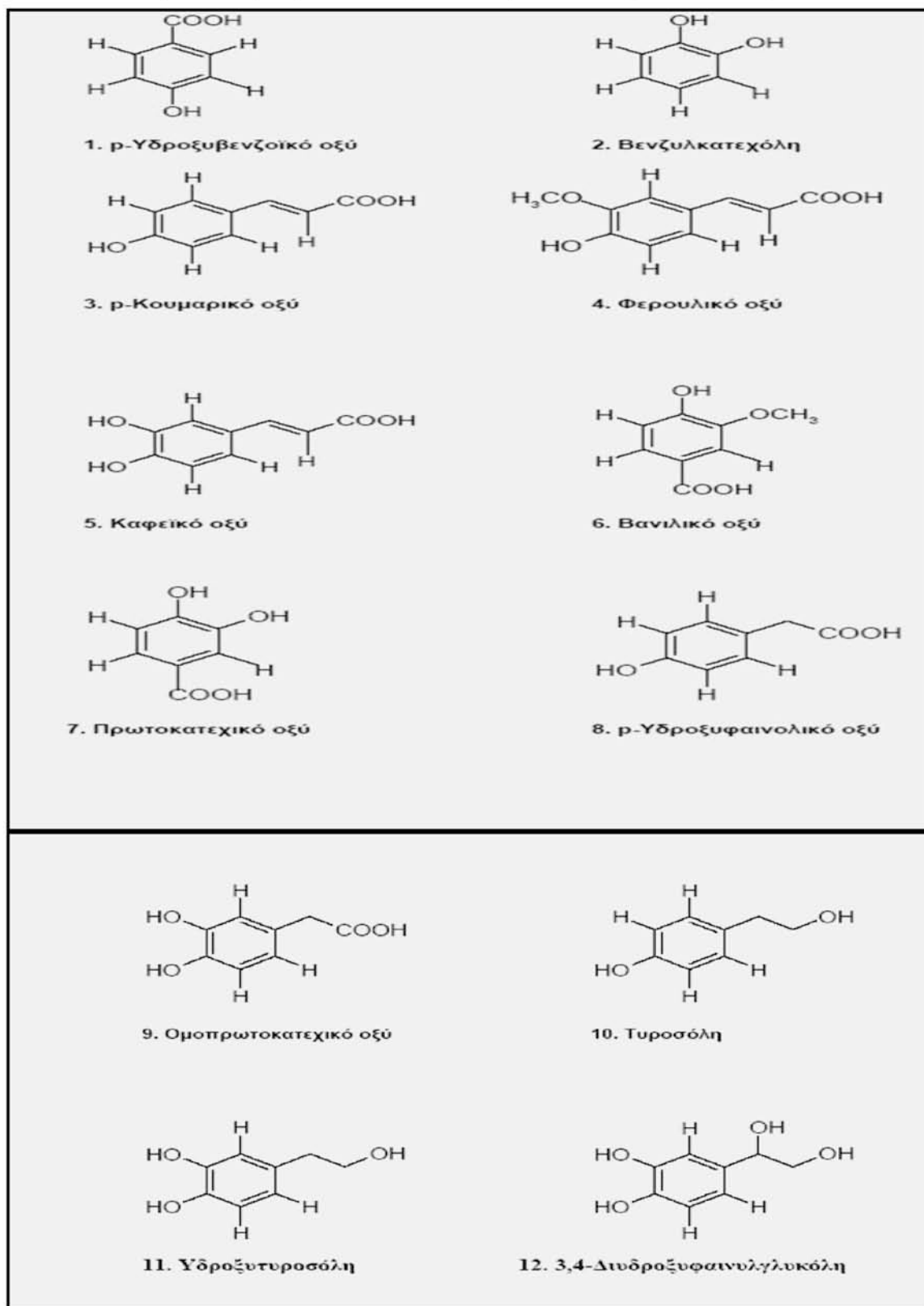
Για παράδειγμα το κιναμικό οξύ, το ελενολικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το κουϊνικό οξύ, φέρονται ως φαινολικά οξέα, παρόλο που βρίσκεται ένας αρωματικός δακτύλιος ή μία υδροξυλομάδα.

Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του ελαιοκάρπου μειώνεται η συγκέντρωση πολυφαινολών λόγω οξειδωτικών και υδρολυτικών διαδικασιών. Λόγω της υδατοδιαλυτότητας των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών, κατά την παραγωγή ελαιόλαδου, επηρεάζουν τις φαινολικές ενώσεις με μερική διάλυση, όπου στη συνέχεια απομακρύνονται με τα απόνερα. (Tsimidou, M., et.al, 1992).

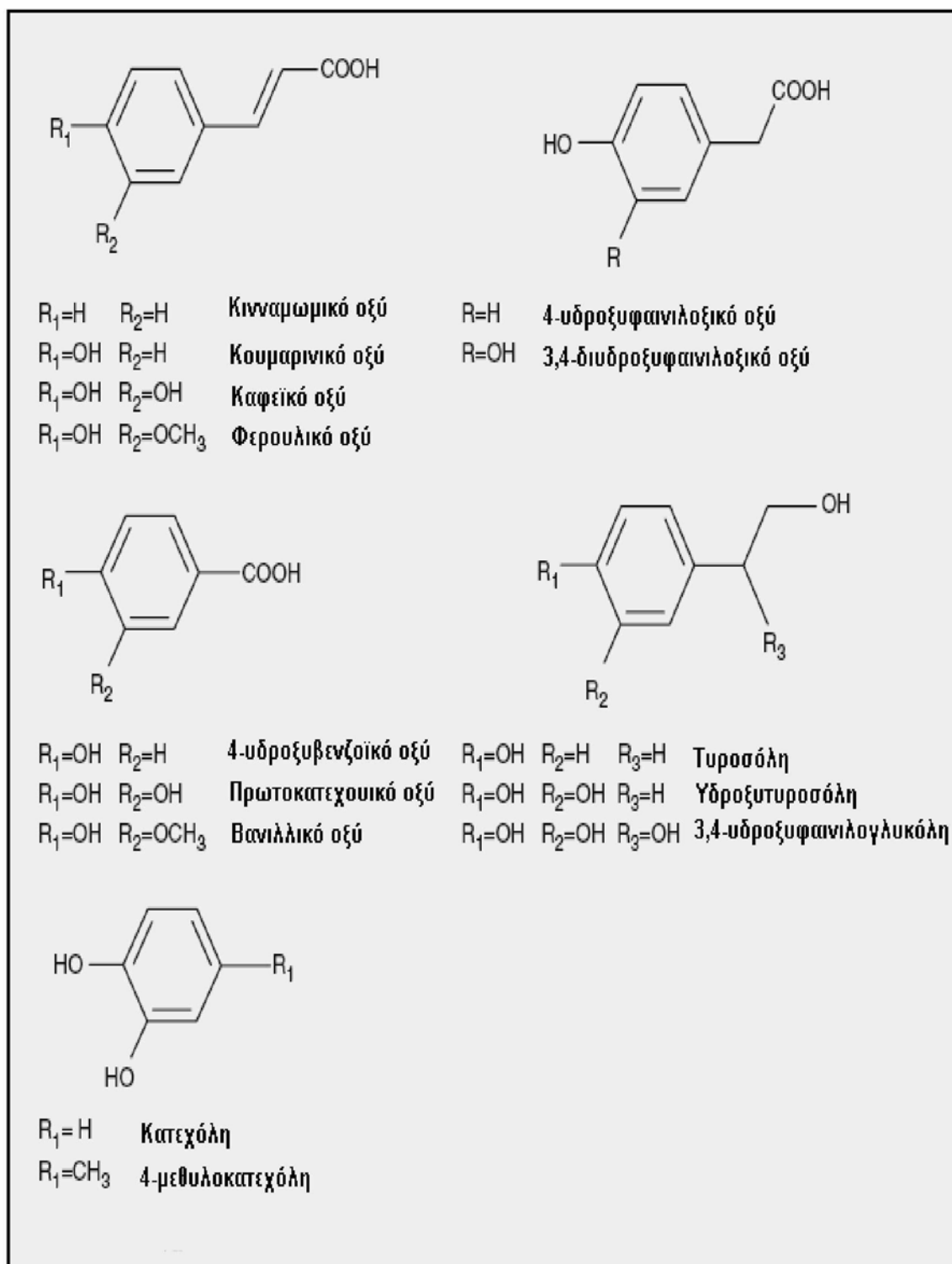
Η Τυροσόλη και η Υδροxyτυροσόλη, είναι τα κύρια φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο. Υπάρχουν και άλλα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο όπως ελαιοευροπαΐνη, καφεϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, σιναπικό οξύ, p-υδροxyβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, γεντιστικό οξύ, σικιμικό οξύ, p-φαινυλοξικό και οι ενώσεις θυμόλη, καρβακρόλη και οι φλαβονοειδείς ενώσεις καμφερόλη, απιγενίνη και κερκετίνη.

1.4.2.3. Φαινολικές ενώσεις στον Κατσίγαρο.

Οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον κατσίγαρο είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι φαινολικές αλκοόλες.



Εικόνα 11. Οι Φαινολικές Ενώσεις που Υπάρχουν στον Κατσίγαρο.



Εικόνα12. Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων. (Niaounnakis & Halvadakis, 2006).

Φαινολικά Συστατικά	Εύρος Τιμών (mg/L)
tyrosol	5 – 100
hydroxytyrosol	35 – 130
Caffeic acid	4 – 12
Elenolic acid	17 – 1430
luteolin	2 – 623
Cinnamic acid	1 - 118

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις Φαινολικών Συστατικών του Κασιόγαρου. (Lesage et.al.,2001).

Η Υδροξυτυροσώλη, είναι αποδεδειγμένα η πολυφαινόλη με το υψηλότερο επίπεδο προστασίας, έναντι των ελευθέρων ριζών που έχει ποτέ αναφερθεί, για τα φυσικά αντιοξειδωτικά. Η μέθοδος O.R.A.C. (Oxygen Radical Absorbance Capacity), μετρά τη δραστικότητα μιας ένωσης, για την προστασία από τις ελεύθερες ρίζες. Ακολουθεί πίνακας με συγκριτικές τιμές, όπου η Υδροξυτυροσώλη κατέχει την πρώτη θέση.

COMPOUNDS	O.R.A.C. (micromole *TE/g)
Hydroxytyrosol	27,000
Fustin	13,600
Myricetin	13,600
Protocatechuic Acid	13,400
Luteolin	12,500
Oleuropein	12,000
Taxifolin	11,800
Quercetin	10,900
Epicatechin (Green Tea)	8,100
Grape Skin Extract	6,200
Ascorbic Acid (Vitamin C)	2,100

*TE = [Trolox equivalent](#)

Πίνακας 6. Συγκριτικές Τιμές με την Μέθοδο O.R.A.C. (in vitro).

Το mole είναι η ποσότητα ύλης συστήματος που περιέχει τόσα στοιχειώδη σωμάτια, όσα είναι τα άτομα που υπάρχουν σε 0,012 χιλιόγραμμα άνθρακος 12. Σύμβολο του είναι «mol». (1micromole = 10^{-6} mole).

1.5. Μέθοδοι Εξαγωγής των Φαινολικών Ενώσεων.

1.5.1. Γενικά.

Εδώ και μερικά χρόνια, έχει εκδηλωθεί ένα τεράστιο ενδιαφέρον, που αφορά στην εξαγωγή – εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων. (Pinelo et al., 2005). Η εξαγωγή λοιπόν, είναι ένα μεγάλο βήμα όσον αφορά στην απομόνωση – ταυτοποίηση και χρήση των φαινολικών ενώσεων. Πρέπει να αναφερθεί πως δεν υπάρχει κάποια ενιαία και τυποποιημένη μέθοδος. Οι πλέον κοινές είναι:

α. Η εκχύλιση με διαλύτη. (Baydar, et.al., 2004 – Bucic, et.al., 2007) και

β. Η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό. (Bleve et al, 2008. Nahar & Sarker, 2005. Palma & Taylor, 1999).

Οι φαινολικές ενώσεις εξάγονταν από την άλεση, την ξήρανση ή τη λυοφιλοποίηση των φρούτων, λαχανικών και αρωματικών φυτών ή μόνο από εκχύλιση των νωπών φυτών με τους κατάλληλους διαλύτες (Merken & Beecher, 2000). Οι μεθοδολογίες αυτές όμως, συνεξάγουν και μη φαινολικές ουσίες, όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα και πρωτεΐνες, που απαιτούν και άλλες διεργασίες καθαρισμού (Castapeda Ovando,et. al., 2009).

1.5.2. Εκχύλιση Υγρού – Υγρού.

Η εκχύλιση υγρού-υγρού είναι μία λειτουργία μεταφοράς μάζας, στην οποία ένα υγρό διάλυμα, που αρχικά περιέχει μία ή περισσότερες διαλυτές ουσίες, αναμιγνύεται καλώς με ένα υγρό (διαλύτη). Ο διαλύτης, παρουσιάζει καλύτερη επιλεκτικότητα προς ένα ή και περισσότερα από τα συστατικά του διαλύματος. Από αυτή την διαδικασία προκύπτουν δύο πράγματα:

- Το εκχύλισμα, που περιέχει το επιθυμητό εξαγώμενο διάλυμα και
- Το ραφινρισμένο, που περιέχει το υπόλοιπο διάλυμα, με μικρή ποσότητα διαλυμένης ουσίας.
- Αυτή η εκχύλιση, λειτουργεί πολύ καλά, εάν επιλεγεί ο κατάλληλος διαλύτης.

1.5.3. Εκχύλιση Στερεού – Υγρού.

Η Εκχύλιση Στερεού – Υγρού ή έκπλυση, μπορεί να οριστεί ως ένα φαινόμενο μεταφοράς μάζας, κατά το οποίο κάποια στερεά μόρια, αρχίζουν

να αποχωρούν από την αρχική τους θέση και να κινούνται μέσα σε ένα διαλύτη, όταν αυτός ο διαλύτης έρθει σε επαφή με το στερεό.

Αυτό το φαινόμενο μεταφοράς της μάζας, μπορεί να ενισχυθεί με αλλαγές στην συγκέντρωση, στον συντελεστή μεταφοράς (*diffusion coefficient- m^2/s*) και στο οριακό στρώμα (*boundary layer*). (Corrales, et.al., 2009). Αυτή η λειτουργία, χρησιμοποιείται ευρέως για ανάκτηση σπουδαίων συστατικών των τροφίμων, όπως φυσικά και αυτών των πολυφαινολικών συστατικών.

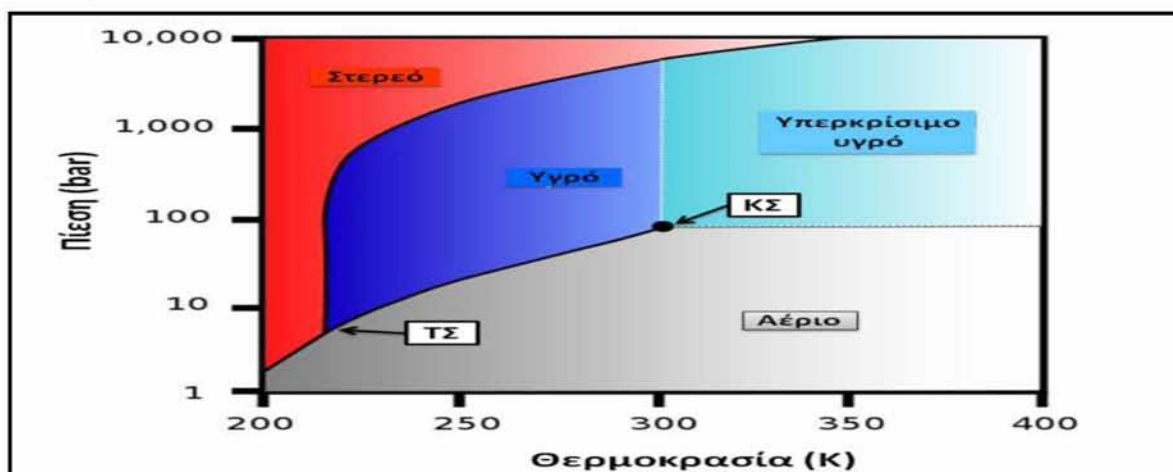
Polyphenolic compounds	Solvent	References
Phenolic acids, flavonols, anthocyanins	Ethyl acetate	Pinelo et al. (2005); Russell et al. (2008)
Anthocyanins, Phenolic acids, catechins, flavanones, flavones, flavonols, procyanidins, ellagic acids, Rutin, chlorogenic acids	Methanol and different aqueous forms (50–90%, v/v)	Bleve et al. (2008); Candi et al. (2007); Ross et al. (2009); Mattila and Kumpulainen (2002)
Anthocyanins, flavonols, free phenolic acids	Ethanol and different aqueous forms (10–90%, v/v)	Altioik et al. (in press); Balas and Popa (2007); Wang et al. (2009); Bleve et al. (2008); Bucic-Kojic et al. (2006); Corrales et al. (2009); Ross et al. (2009)
Flavonols, free phenolic acids	Chloroform	Shanififar, Dehghn-Nudeh, and Murtajaldini (2009)
Flavonols, phenolic acids	Diethyl ether	Ross et al. (2009)
Procyanidins, phenolic acids	Hot water 80–100.	Diouf, Stevanovic, and Cloutier (2009)
Tannins, bound phenolic acids	NaOH (2 N–10 N)	Nardini et al. (2002); Popa et al. (2008); Ross et al. (2009)
Phenolic compounds, phenolic acids	Petroleum ether	Zhang et al. (2009)
Flavonols, phenolic acids, hydroxycinnamic acids, coumarins, Flavonols xanthenes	Acetone/water 10–90% (v/v)	Altioik et al. (in press); Nacz & Shahidi (2006); Shanififar et al. (2008); Schieber et al. (2003)
Flavonols, phenolic acids, simple phenolics, anthocyanins	n-Hexane, isooctane, ethyl acetate	Alonso Garcia et al. (2004)
Polyphenols from olive leaves, oleuropein and rutin	Acetone, ethanol and their aqueous forms (10–90%, v/v)	Altioik et al. (in press)
Flavonols, quercetin 3,4'-diglucoside and quercetin 4'-monoglucoside.	Methanol/water 70% v/v	Candi et al. (2007)

Πίνακας 7. Οργανικοί Διαλύτες που Χρησιμοποιούνται για την Εξαγωγή των Πολυφαινολών. (Ignat I, et.al, 2011)

1.5.4. Υπερκρίσιμη Εκχύλιση Ρευστού (SFE - *Supercritical Fluid Extraction*).

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση ρευστού (SFE) θα μπορούσε να είναι μια περιβαλλοντικά ευεργετική εναλλακτική λύση, έναντι της συμβατικής εκχύλισης, με οργανικό διαλύτη των βιολογικών ενώσεων. Οι μέθοδοι (SFE) είναι ταχείες, αυτοματοποιημένες, επιλεκτικές και αποφεύγεται η χρήση μεγάλων ποσοτήτων τοξικών διαλυτών. Επιπλέον, η απουσία του φωτός και του αέρα κατά τη διάρκεια της εκχύλισης μειώνει την υποβάθμιση του τελικού προϊόντος, που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια των παραδοσιακών τεχνικών εκχύλισης. (Bleve et.al., 2008). Αυτή η εκχύλιση βασίζεται στο γεγονός ότι, πλησίον του κρίσιμου σημείου, το υγρό αλλάζει τις ιδιότητές του, μόνο με μερικές διακυμάνσεις στην πίεση (Palenzuela et.al., 2004).

Τα υπερκρίσιμα ρευστά τα τελευταία χρόνια, λαμβάνουν την θέση οργανικών διαλυτών, όπως το εξάνιο, το διχλωρομεθάνιο, το χλωροφόρμιο και άλλα, που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανική εκχύλιση, καθαρισμό και λειτουργίες κρυστάλλωσης. Μέχρι στιγμής, το υπερκρίσιμο υγρό που χρησιμοποιείται, είναι αυτό του διοξειδίου του άνθρακα (SC-CO_2), που δεν επιβαρύνει το περιβάλλον, είναι χαμηλής τοξικότητας, δεν είναι αναφλέξιμο και παρέχει συμβατότητα με τα επεξεργασμένα τρόφιμα. Επιπλέον, έχει μέτρια κρίσιμες συνθήκες, μπορεί εύκολα να διαχωριστεί από διαλυμένες ουσίες και είναι φθινό.



Γράφημα 4. Φάσεις του CO_2 με το Τριπλό Σημείο (ΤΣ) και το Κρίσιμο Σημείο (ΚΣ). ($300^\circ\text{K} = 26,85^\circ\text{C}$)

1.6. Η ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ.

1.6.1. Γενικά.

«Η τροφή μπορεί να είναι φάρμακο για τον άνθρωπο και το φάρμακο μπορεί να αναζητηθεί στην τροφή»

Ιπποκράτης, 460-377 π.χ.

Η κύρια πηγή για τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά είναι η διατροφή, μιας και οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε ποικιλίες τροφίμων που περιέχουν φυτοθρεπτικά συστατικά. Τα περισσότερα όσπρια, φρούτα όπως (μήλα, μούρα, πεπόνι, κεράσια, σταφύλια, αχλάδια, δαμάσκηνα, βατόμουρα, φράουλες) και λαχανικά (όπως μπρόκολο, λάχανο, σέλινο, κρεμμύδι και μαϊντανός) είναι πλούσια σε πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά. Το κόκκινο κρασί, η σοκολάτα, το πράσινο τσάι, **το ελαιόλαδο**, η γύρη της μέλισσας είναι επίσης άλλες σημαντικές πηγές.

Τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να εξολοθρεύουν τις ελεύθερες ρίζες και να ανάγουν ορισμένες χηλικές αντιδράσεις: τα δραστικά ιόντα που περιέχουν οξυγόνο (ελεύθερες ρίζες) πρέπει να αφαιρούνται από τα κύτταρα συνεχώς για να διατηρηθεί ο σωστός μεταβολισμός. Η ύπαρξη μιας πληθώρας από πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά, βάσει μελετών μπορούν:

- Να μειώσουν τις φλεγμονώδεις επιδράσεις, όπως της στεφανιαίας νόσου, και να βελτιώσουν την υγεία των ενδοθηλίων, περιορίζοντας την οξείδωση της χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL).
- Να συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου – οι πολυφαινόλες που αναφέρονται για την πρόληψη του καρκίνου είναι η κατεχίνη επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα.
- Να καθυστερήσουν την διαδικασία της γήρανσης.
- Να προστατεύσουν τις λιπομεμβράνες των κυττάρων, τις πρωτεΐνες και το DNA.

Η κύρια πηγή για τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά είναι η διατροφή, μιας και οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε ποικιλίες τροφίμων που περιέχουν φυτοθρεπτικά συστατικά.

Ένα πολυφαινολικό αντιοξειδωτικό, είναι ένας τύπος αντιοξειδωτικού που

περιέχει μία πολυφαινολική δομή. Σε σχέση με την ανθρώπινη υγεία αυτές οι ενώσεις, που απαριθμούν πάνω από 8.000 διαφορετικά είδη, θεωρούνται σημαντικές για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, μία παθολογική κατάσταση, που είναι η αιτία για νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καρδιοπάθειες και τον καρκίνο.

Πριν παρουσιασθεί όμως, η βιοδραστικότητα των πολυφαινολών από τα απόβλητα του ελαιολιβερίου, σκόπιμο είναι να αναφερθεί το οξειδωτικό στρες, πως προκαλείται και με ποιούς τρόπους αντιμετωπίζεται.

1.6.2. Οξειδωτικό Στρες.

1.6.2.1. Ιστορική Αναδρομή.

Η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο *‘μπορεί να σβήσει το κερί της ζωής πολύ γρήγορα.’* (Priestley, 1775). Η προφητική αυτή παρατήρηση από τον άνθρωπο που ανακάλυψε το οξυγόνο, έβαλε ουσιαστικά τα θεμέλια για τη λύση ενός προβλήματος, από τα σημαντικότερα της σύγχρονης επιστήμης: αυτό που ονομάζουμε «παράδοξο του οξυγόνου».

Το O_2 , ένα τόσο κρίσιμο στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής, μπορεί να γίνει κάποια στιγμή **τοξικό**. Αρχικά, έγινε αντιληπτό ότι έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου, προκαλεί ανεπιθύμητες αντιδράσεις για την υγεία, ενώ λίγο αργότερα, αρχίσαμε να έχουμε ενδείξεις ότι οι επιπτώσεις από **ιοντίζουσες ακτινοβολίες** ήταν παρόμοιες με αυτές της «δηλητηρίασης» από το O_2 .

Σε άρθρο με τίτλο: Δηλητηρίαση από Οξυγόνο και από Ακτινοβολία Χ: Ένας παρόμοιος Μηχανισμός (Gerschman R., et.al. 1954.), που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό *Science*, προτάθηκε για πρώτη φορά, ότι ο παράγοντας που ενοποιούσε τα αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με αυτά της «δηλητηρίασης» από το O_2 , ήταν αυτό που αποκαλούμε **ελεύθερες ρίζες**.

Τα τελευταία χρόνια, συγκεντρώνονται όλο και περισσότερα ερευνητικά δεδομένα, για τη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση πολλών ασθενειών, καθώς και για τη σχετική προστατευτική δράση αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων.

1.6.2.2. Ελευθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O_2 .

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό σε - *μικρότερη ενεργειακή κατάσταση*- και ως εκ τούτου λιγότερο δραστικό.

Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές -σε *μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση*- και συνεπώς πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων.

Οι αντιδράσεις αυτές λέγονται οξειδοαναγωγικές (*redox*). Κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων, από ένα άτομο. Πολύ γνωστό μας παράδειγμα οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, αποτελεί η οξείδωση των μετάλλων, από το οξυγόνο της ατμόσφαιρας, το γνωστό σκούριασμα.

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία, λέγεται **ελεύθερη ρίζα** και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια. Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης. (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*triplet state*) και συμβολίζεται με $3O_2$, δεν είναι ιδιαίτερα δραστική.

Το μοριακό όμως αυτό οξυγόνο μπορεί να ενεργοποιηθεί, έτσι ώστε τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singlet state*) και συμβολίζεται με $*O_2$.

Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ).

Τα κυριότερα ΔΕΟ είναι:

- η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$),
- η ρίζα υδροξυλίου ($-OH^{\cdot}$),
- η ρίζα υπεροξειδίου ($-ROO^{\cdot}$),
- το O_2 απλής κατάστασης,
- το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)
- και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$).

Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\cdot}), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα (με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα).

1.6.2.3. Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας.

Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στον οργανισμό μας, είτε από

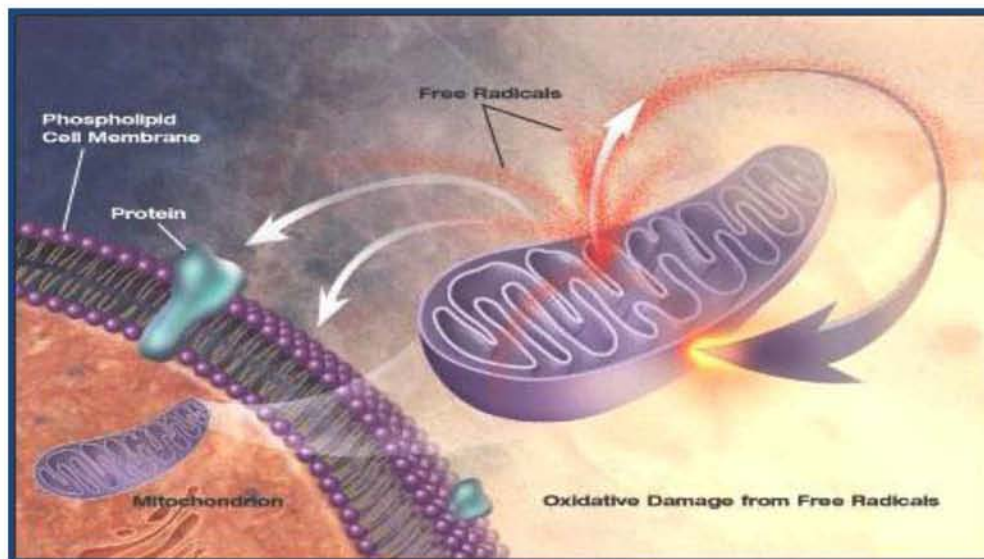
φυσιολογικές διαδικασίες του είτε από εξωτερικές πηγές. Οι κυριότερες από τις φυσιολογικές διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν:

(α) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, ως παραπροϊόν ή «χημικό ατύχημα» κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο, ανάγοντάς το σε σουπεροξειδίο.

(β) Τη φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες όπου παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων.

(γ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες είναι και οι πλέον δραστικές, με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων.

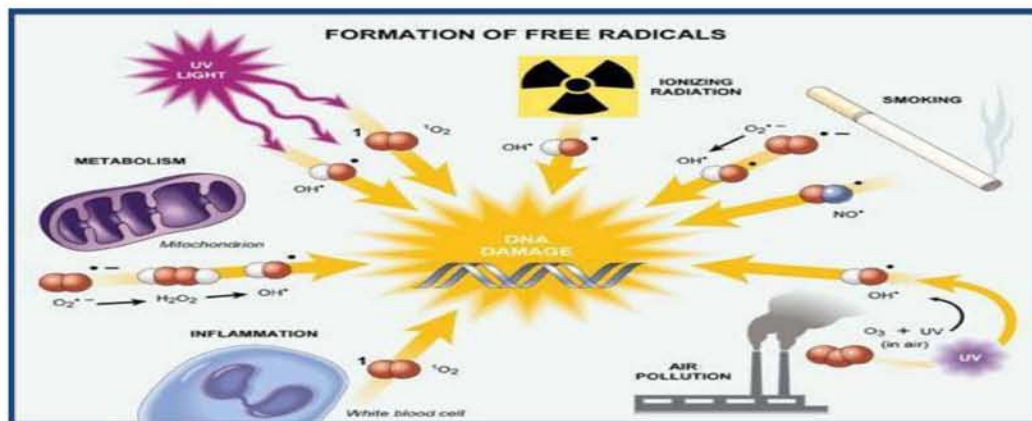
(δ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα.



Εικόνα13. Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών.

Ένας αριθμός παραγόντων που βρίσκεται εκτός του σώματος μας μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών από τη στιγμή που

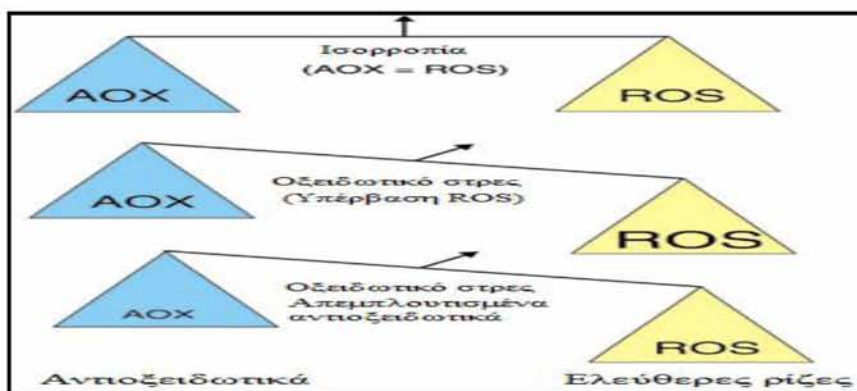
θα έρθει σε επαφή με το σώμα μας. Μερικά παραδείγματα τέτοιων πηγών αποτελούν ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-Χ, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξειδία).



Εικόνα 14. Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.

1.6.2.4. Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας.

Σε κάθε βιολογικό σύστημα, πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ΔΕΟ. Έχει υπολογισθεί ότι περίπου 10.000 ελεύθερες ρίζες τη μέρα «Βομβαρδίζουν» κάθε κύτταρο μας. (Rosen G.M., et.al., 1999). Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ΔΕΟ οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται **οξειδωτικό στρες** και είναι παράγοντας πρόκλησης ασθενειών. Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ΔΕΟ και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες.



Εικόνα 15. Οξειδωτικό Στρες.

Γενικά χαρακτηρίζουμε ως **αντιοξειδωτική ουσία** κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M., 2001).

Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

- (1) Είτε παρεμποδίζουν τη δημιουργία ΔΕΟ,
- (2) είτε σταματούν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Επίσης είναι δυνατόν, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (για παράδειγμα της βιταμίνης C), να συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού, όπως της τοκοφερόλης.

Στην περίπτωση αυτή, έχουμε συνεργατική δράση των δύο αντιοξειδωτικών και λέμε ότι η βιταμίνη C έχει συν-αντιοξειδωτική δράση.

Ο όρος **οξειδωτικό στρες** περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας, ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου *Reactive Oxygen Species* - (ROS) και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, et.al., 2004).

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

(1) Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.

(2) Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

Μπορούμε επίσης, να διαφοροποιήσουμε τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με την προέλευση τους και τη χημική τους σύσταση.

Έτσι υπάρχουν:

- (1) Ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες και
- (2) Αντιοξειδωτικά τα οποία προσλαμβάνει ο οργανισμός μας με την τροφή.

ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	
ΜΕΓΑΛΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ	ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ
<p><u>Ένζυμα:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Δισμουτάση του υπεροξειδίου • Καταλάση • Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης • Παραοξονάση • Πρωτεόσωμα <p>Ελαττώνουν τη δημιουργία ΔΕΟ μέσω της απομάκρυνσης οξειδωτικών ή μετατρέποντας τα ΔΕΟ, σε σχετικά σταθερές χημικές ενώσεις.</p> <p>Περιλαμβάνονται επίσης:</p> <p><u>Πρωτεΐνες του πλάσματος (αίμα):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Αλβουμίνη. • Σερουλοπλασμίνη. • Τρανσφερίνη. • Ατογλοβίνη. <p>Δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα και ως εκ τούτου περιορίζουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από μέταλλα.</p>	<p><u>Λιποδιαλυτά Αντιοξειδωτικά</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Τοκοφερόλη (βιταμίνη Ε). • Καροτενοειδή. • Χολερυθρίνη. • Ορισμένες Κινόνες. • Πολυφαινόλες. <p><u>Υδατοδιαλυτά Αντιοξειδωτικά</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C). • Ουρικό οξύ . • Πολυφαινόλες.

Πίνακας 8. Ενδογενή Αντιοξειδωτικά.

Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά της διατροφής αποτελούν λιποδιαλυτές και υδατοδιαλυτές φυτικές ενώσεις όπως η τοκοφερόλη, το καροτένιο, το λυκοπένιο, η βιταμίνη C, η λουτεΐνη και διάφορες πολυφαινόλες (φλαβονοειδή και άλλες ενώσεις).

1.6.3. Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.

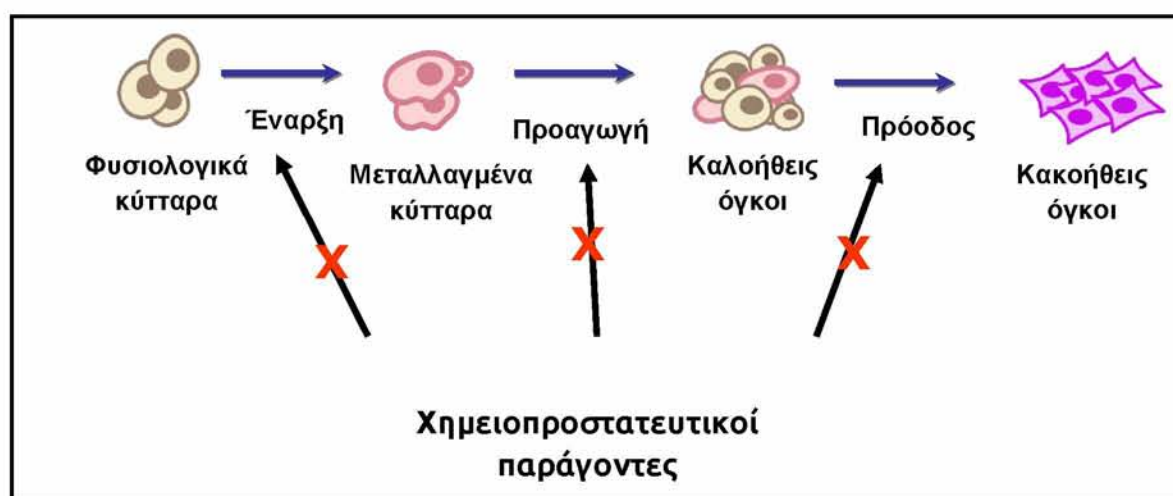
Έχει γίνει πλέον επιστημονικά αποδεκτό ότι η παραβίαση της απαραίτητης οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων μας προς την κατάσταση του οξειδωτικού στρες, έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, ενώ επιπλέον, συμμετέχει και στη

διαδικασία της γήρανσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οξείδωση των βασικών βιοχημικών συστατικών του κυττάρου, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA με αποτέλεσμα τη μεταβολή των δομικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων.

Ο κατάλογος των ασθενειών για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς και περιλαμβάνει καρδιαγγειακές παθήσεις, τον καρκίνο, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τον καταρράκτη, τον διαβήτη και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες.

Τα ΔΕΟ αρχικά οξειδώνουν μόνο τα φωσφολιπίδια της LDL. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο και τη μετατροπή τους σε μακροφάγα κύτταρα. Στη συνέχεια έχουμε οξείδωση και της πρωτεΐνης της LDL, οπότε λέμε ότι η LDL είναι πλήρως οξειδωμένη. Η οξειδωμένη LDL μεταφέρεται στο εσωτερικό των μακροφάγων μέσω ειδικών υποδοχέων, 3-4 φορές ταχύτερα από τη μη-οξειδωμένη LDL, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων οξειδωμένης LDL μέσα στα μακροφάγα τα οποία μετατρέπονται έτσι σε αφρώδη κύτταρα. Καθώς τα αφρώδη κύτταρα συσσωρεύονται κάτω από το ενδοθήλιο έχουμε την έναρξη του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας, η οποία και οδηγεί περαιτέρω στην κλινική εκδήλωση της νόσου.

Ένα άλλο παράδειγμα, σύμφωνα με τη θεωρία του πολυσταδιακού μοντέλου, οι μεταλλάξεις αποτελούν βασικό παράγοντα και στα τρία στάδια της καρκινογένεσης: στην έναρξη (initiation), στην προαγωγή (promotion) και στην πρόοδο (progression). (Greenwald, 1995).



Εικόνα 16. Δράση Χημειοπροστατευτικών Παραγόντων.

Η έναρξη, το πρώτο στάδιο, προκαλείται από τη δημιουργία μη αντιστρεπτών βλαβών στο DNA (πιθανότητα σε γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση) σε ένα 'αρχικό κύτταρο' (initiated cell) που βρίσκεται κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Έτσι δημιουργείται ένα κύτταρο που μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων από ότι κανονικά θα έκανε (Trosko και Chang 1989).

Στο δεύτερο στάδιο, στην προαγωγή, τα αρχικά μεταλλαγμένα κύτταρα πολλαπλασιάζονται κάτω από την επίδραση μιτογόνων παραγόντων (προαγωγέων) με τελική κατάληξη το σχηματισμό ενός κλώνου από μεταλλαγμένα κύτταρα. Σε ένα από αυτά τα κύτταρα, μία 'κρίσιμη' μετάλλαξη το μετατρέπει στο πρώτο προ-καρκινογόνο κύτταρο. Η προαγωγή συνήθως διαρκεί αρκετά χρόνια και είναι ένα αντιστρεπτό στάδιο αφού αφαίρεση του προαγωγέα συχνά έχει ως αποτέλεσμα ο ιστός να επανέρθει στην φυσιολογική του κατάσταση αν και θα περιέχει 'αρχικά κύτταρα' (Trosko et.al., 1983).

Στο τελικό μη αντιστρεπτό στάδιο, στην πρόοδο, το προ-καρκινικό κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό εξαιτίας νέων μεταλλάξεων που έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση του καρκινικού φαινότυπου, δηλαδή ενός κυτταρικού κλώνου με αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, διείσδυσης και μετάστασης (Kerbel et. al., 1984).

Στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, στο οποίο εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, έχουν μελετηθεί τα τελευταία χρόνια, πλήθος φυτικών εκχυλισμάτων, σχετικά με την πιθανή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους, που οφείλονταν κυρίως στις φυτικές πολυφαινόλες που περιείχαν. (Stagos D et al., 2012). Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν η αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση της αμπέλου σε εκχυλίσματα από τον καρπό του φυτού, τόσο από τα γίγαρτα και τους βόστρυχους όσο και από τα στέμφυλα. Επιπλέον, εξετάστηκε η βιολογική δράση εκχυλισμάτων (μεθανολικών και υδατικών) και πολυφαινολικών κλασμάτων από Ελληνικές ποικιλίες αμπέλου, Μανδηλαριά Σαντορίνης (κόκκινα σταφύλια) και Ασσύρτικο Σαντορίνης (άσπρα σταφύλια), καθώς και μονομερών φυτικών πολυφαινολών που ανιχνεύτηκαν σε αυτά. Τα περισσότερα εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς και

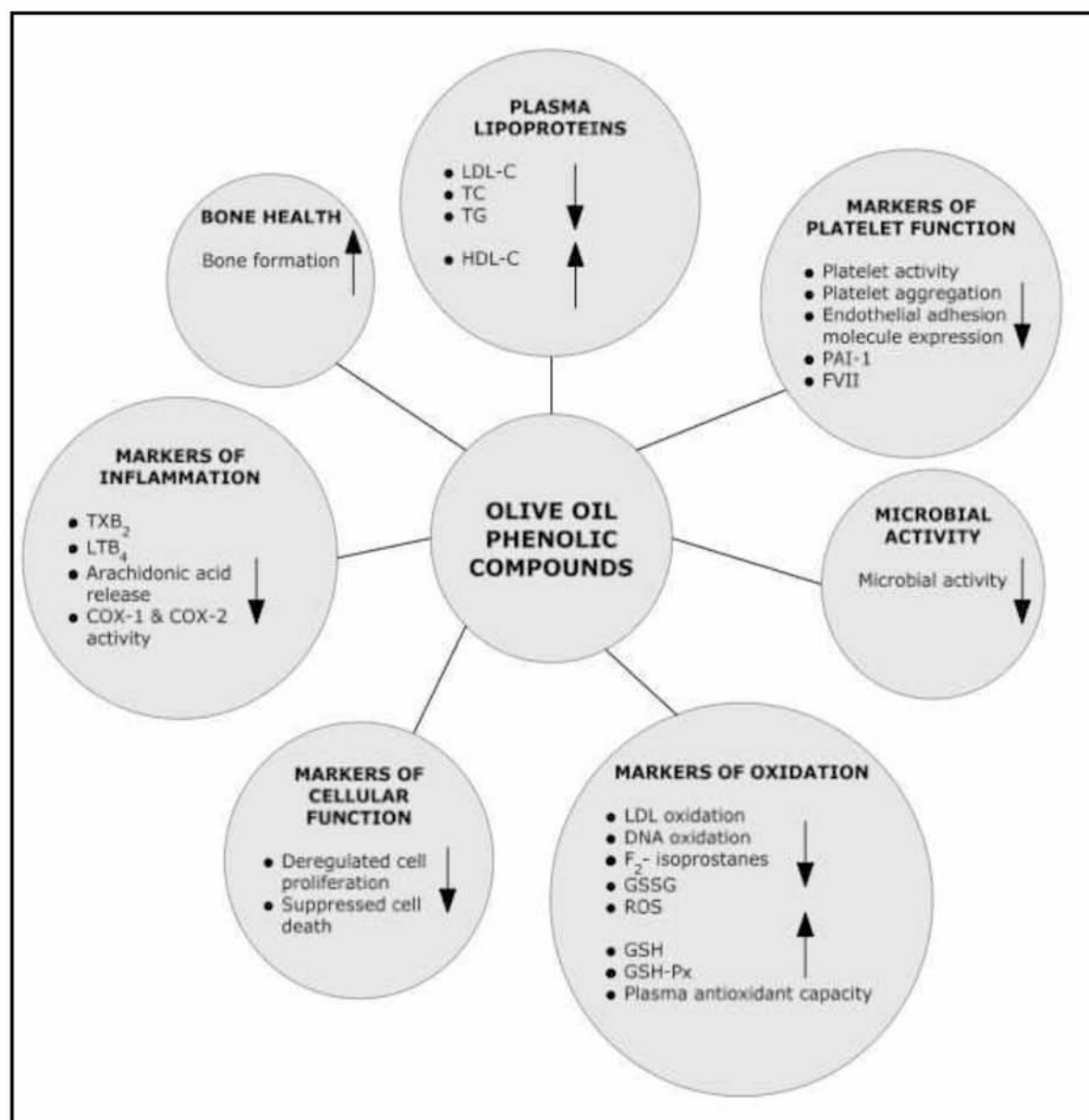
εξαιρετική προστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης από τις ελεύθερες ρίζες, βλάβη του DNA. (Stagos D et al., 2007; Spanou C et al. 2007)

Ακόμη και στα πλαίσια της αναζήτησης από το εργαστήριο νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων, μελετήθηκαν υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα, που προέκυψαν από έναν μεγάλο αριθμό φυτών Ελληνικών ψυχανθών. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι, τα εκχυλίσματα μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, παρουσίασαν σημαντική ικανότητα να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Επιπλέον, επηρέαζαν τη δραστικότητα ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. (Spanou CI et al., 2012; Spanou CI et al., 2008).

1.6.4. Πολυφαινόλες από Απόβλητα Ελαιотριβείου – Βιοδραστικότητα.

1.6.4.1. Βιοδραστικότητα - Γενικά.

Πλήθος ερευνών - μελετών, υποστηρίζουν την άποψη πως οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο και κατά συνέπεια στα απόβλητά του, είναι ικανές να δρουν ως φυτοχημικά αντιοξειδωτικά.



Εικόνα 17. Αποτελεσματικότητα των Πολυφαινολικών Συστατικών του Ελαιολάδου σε Βιοδείκτες της Ανθρώπινης Υγείας. (Cicerale, S. et.al., 2010).

Παρακάτω, οι μελέτες παρουσιάζονται ανάλογα με την συγκεκριμένη – στοχευμένη βιοδραστικότητα.

1.6.4.2.. Καρδιαγγειακό.

1). Η επίδραση των πολυφαινολών του ελαιολάδου, στα αντισώματα, κατά της οξειδωμένης LDL - *Low Density Lipoprotein*. (Olga Castaner, et. al., 2011).

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να εκτιμηθούν οι επιδράσεις των πολυφαινολών του ελαιολάδου, στην ανοσογονικότητα της οξειδωμένης LDL, σε σχέση με την δημιουργία αυτοαντισωμάτων.

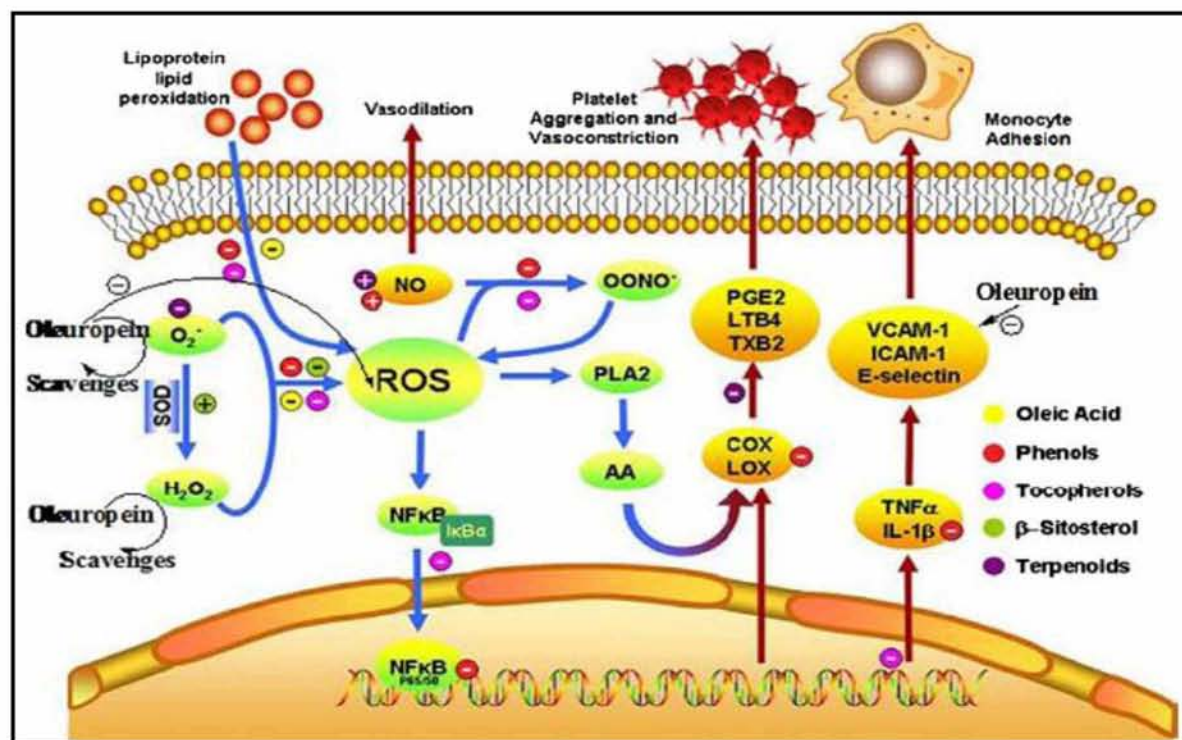
Διακόσιοι (200) υγιείς άνδρες, σε διάστημα τριών (3) εβδομάδων διαχωρίστηκαν τυχαία σε ομάδες. Η πρώτη ομάδα ελάμβανε υψηλή φαινολική δόση (366mg/kg). Η δεύτερη ομάδα μία μέση δόση (164 mg/kg) και η τρίτη ομάδα μία χαμηλή δόση (2.7 mg/kg).

Variable	OLAB1st <306 U/L n = 62	OLAB2nd [306-1099] U/L n = 62	OLAB3rd >1099 U/L n = 62	P-value for linear trend
Age, years	37(12)	33(11)	30(9)	0.020
Educational Level 1, (%) Tertiary education	21 (12.5%)	12 (7.3%)	15 (9.1%)	0.260
Educational level 2, (%) Primary and Secondary studies	37 (22.4%)	42 (25.5%)	303 (254)	0.494
Physical activity Kcal/day expended	320 (270)	262 (172)	0.56 (0.06)	0.192
Waist/Hip ratio	0.87 (0.06)	0.87 (0.05)	23.5 (2.7)	0.108
BMI, Kg/m ²	24.3 (2.9)	23.8 (2.8)	125 (13)	0.428
SBP, mm Hg	124(11)	123 (13)	77 (8)	0.697
DBP, mm Hg	77(8) 87(10)	76(8)	87(11)	0.181
Glucose mg/dL	194(43)	83 (8)	173 (37)	0.025
Total cholesterol, mg/dL	49(12) 125 (39)	182 (39)	47.5 (11)	0.979
HDL-cholesterol, mg/dL		45(10)	107 (31)	0.046
LDL-cholesterol, mg/dL	79.5 (62-114)	119 (37)	78 (58-109)	0.145
Triglycerides, mg/dL	55.7 (24.9) 1.4 (0.6)	88(64-115)	43.5 (19.3)	0.001
Oxidized LDL, U/L		49.6 (23.2) 1.3 (0.4)	1.28 (0.40)	0.094
Hydroxy-fatty acid, mmol/L	30.29 (7.9)	(0.4) 29.1(5.3)	28.4 (6.6)	0.700
F2-Isoprostanes ng/L	2.41 (1.3)	2.70 (1.04)	3.01 (1.23)	0.058
Uninduced conjugated dienes mmol/mmol of total cholesterol	1.30 (0.14)	1.22 (0.10)	1.23 (0.09)	0.050
Oxidized glutathione mmol/L				

Πίνακας αποτελεσμάτων των συμμετεχόντων στη μελέτη

Το συμπέρασμα ήταν πως οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου, προωθούν την δημιουργία OLAB (OxLDL autoantibodies – Αυτοαντισώματα της οξειδωμένης LDL). Παρατηρήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα, σε υψηλές συγκεντρώσεις της οξειδωμένης LDL.

2) Καρδιοπροστατευτικός και νευροπροστατευτικός ρόλος της ελευρωπαΐνης στο ελαιόλαδο. (Syed Haris Omar. 2010).



Προτεινόμενο μοντέλο για τους μηχανισμούς δράσης της του ελαιικού οξέως και άλλων ενώσεων του ελαιολάδου, με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Στην παρούσα εργασία, αναφέρεται πως παρά τον αριθμό των μελετών που συμβάλλουν σε αυτό το μοντέλο, πρέπει να συμπληρωθούν αρκετά κενά με περαιτέρω έρευνα και αφορά στον κύριο μηχανισμό, με τον οποίο τα συστατικά του ελαιολάδου επηρεάζουν την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, με αποτέλεσμα την αναστολή και / ή απομάκρυνση των ROS.

Η μελέτη υποστηρίζει πως το ελαιικό οξύ, η ελευρωπαΐνη και η β-σιτοστερόλη (φυτική στερόλη), ενδέχεται ενδοκυτταρικά, να μειώνουν τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, με το να δημιουργούν ένα λιγώτερο οξειδωτικό περιβάλλον. Η β-σιτοστερόλη μπορεί επίσης να ενισχύσει την δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD activity), μειώνοντας έτσι τα επίπεδα του οξυγόνου. $M + \text{O}_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} M^{(n+1)} + H_2O_2$. Όπου $M = Cu, Mn, Fe$ ή Ni

Οι SOD σε 3 κατηγορίες δεσμεύουν, χαλκό και ψευδάργυρο ή μαγγάνιο και σίδηρο ή νικέλιο.

Η μείωση αυτή έχει επίσης παρατηρηθεί και στο τερπενοειδές ολεανολικό οξύ, παρόλο που ο μηχανισμός δεν είναι σήμερα γνωστός. Οι τοκοφερόλες και οι φαινολικές ενώσεις είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά που μπορούν να βοηθήσουν στη μείωση της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, με την απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και των νιτρικών μονοξειδίων NO^\bullet .

Το νιτρικό μονοξείδιο είναι ένα σημαντικό μόριο κυτταρικής σηματοδότησης, που εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Ισχυρό αγγειοδιασταλτικό με μια σύντομη ημιζωή από λίγα δευτερόλεπτα στο αίμα.

Επίσης, μειώνεται ο σχηματισμός των νιτρικών ιόντων OONO^\bullet . Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου μπορεί να ενεργοποιήσουν τον πυρηνικό παράγοντα NFκB που είναι ένας πρωτεϊνικός παράγοντας που ανακαλύφθηκε το 1986. Σήμερα, είναι γνωστό ότι εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών (Karin et al., 2005). Αυτός ο παράγοντας, που συνδέεται με αλληλουχίες αναγνώρισης στο DNA και επάγει την γονιδιακή έκφραση, με την παρουσία των ελεύθερων ριζών, μετατοπίζεται μέσα στον πυρήνα.

3). Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου καταστέλουν την προσκόλληση της ομοκυστεΐνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ανεξάρτητα από την διαφορετική τους αντιοξειδωτική δράση. (Manna C, et.al. 2009).

Πρέπει να αναφερθεί πως, η ομοκυστεΐνη είναι ένα θειούχο αμινοξύ το οποίο παράγεται ενδοκυτταρικά, από τον μεταβολισμό της μεθειονίνης (ένα από τα απαραίτητα αμινοξέα) και διοχετεύεται στην κυκλοφορία μέσω του πλάσματος, κυρίως σε οξειδωμένη μορφή, δεσμευμένη σε πρωτεΐνες.

Η ομοκυστεΐνη, επηρεάζει τη μεθυλίωση και γι' αυτό είναι πολύ σημαντική. Η μεθυλίωση είναι η διαδικασία κατά την οποία χιλιάδες νευροδιαβιβαστές, ορμόνες και άλλα βασικά βιοχημικά συστατικά βρίσκονται σε ισορροπία, δηλαδή τα μεθύλια προσκολλώνται σε τοξίνες με σκοπό να τις αποβάλλουν από τον οργανισμό.

Η μεθυλίωση βοηθά επίσης στην δημιουργία των φιλικών λιπαρών για τον εγκέφαλο (φωσφολιπίδια) και ακόμα ελέγχει την έκφραση των γονιδίων.

Με χαμηλή ομοκυστεΐνη έχουμε ισορροπία στο σώμα, εάν όμως έχουμε αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, διαταράσσεται η μεθυλίωση, προκαλείται ερεθισμός και φλεγμονή στα εσωτερικά τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων και αυξάνεται ο κίνδυνος του εμφράγματος, γιατί οι βλάβες στα τοιχώματα των αρτηριών προκαλούν την εναπόθεση πλακών, που οδηγούν στη στένωση και τελικώς στο έμφραγμα.

4). Επιδράσεις των πολυφαινόλων του ελαιολάδου, στην οξειδωτική βλάβη των ερυθροκυττάρων. (Paiva-Martins F., et.al, 2009). Εδώ, διαπιστώθηκε πως η 3,4-DHPEA-EDA (3-Υδροξυτυροσόλη), μία πολυφαινόλη του ελαιολάδου, μπορεί να διαδραματίσει έναν αξιοσημείωτο προστατευτικό ρόλο έναντι των ROS που προκαλούν οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα του ανθρώπου. Χαμηλότερες δόσεις αυτής της ένωσης, ήταν ικανές για την προστασία των ερυθρών αιμοσφαιρίων *in vitro* και στην αποτροπή της αιμόλυσης.

5). Η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από φαινόλες ελαιολάδου, μέσω cAMP-φωσφοδιεστεράσης. (Dell'Agli M., et.al., 2008). Το κυκλικό AMP (cAMP ή 3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη), είναι ένας αγγελιοφόρος σημαντικός σε πολλές βιολογικές διαδικασίες. Προέρχεται από τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και χρησιμοποιείται για την ενδοκυττάρια μετάδοση σημάτων στους οργανισμούς. Η cAMP, συντίθεται από την ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) από την αδενυλική κυκλάση, που βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Καταλύεται από το ένζυμο της φωσφοδιεστεράσης, το οποίο καταλύει με υδρόλυση τον φωσφοδιεστερικό δεσμό. Στην παραπάνω εργασία, χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα αιμοπετάλια, που διεγείρονταν με θρομβίνη και έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης αυτών. Χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα και πολυφαινόλες ελαιολάδου. Το φαινολικό περιεχόμενο των HPE (high phenol content), ήταν μεταξύ 250 and 500 mg/kg, ενώ των LPH (low phenol levels) 46 mg/kg. Τελικά, η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από φαινόλες ελαιολάδου, κατά 50% κυμάνθηκε από 1,23 έως 11,2 µg/ml.

6). Αντι-Αθηρωματικά συστατικά του ελαιολάδου. (Visioli F, et.al. 2001). Αυτή η εργασία είναι μία βιβλιογραφική ανασκόπηση. Αναφέρεται στο ότι το ελαιόλαδο, είναι η κύρια πηγή των λιπαρών στην Μεσογειακή διατροφή, με αποτέλεσμα, την παρουσία μικρού σχετικά αριθμού της στεφανιαίας νόσου και ορισμένων μορφών καρκίνου. Το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό μονοακόρεστων (ελαϊκό οξύ), αλλά η κύρια ιδιαιτερότητα του έξτρα-παρθένου ελαιολάδου, είναι η παρουσία σημαντικών ποσοτήτων των φαινολικών ενώσεων, κυρίως υδροξυτυροσόλης και ελευρωπαΐνης, που παρέχουν υψηλή σταθερότητα και την έντονη γεύση.

Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα φαινολικά συστατικά της ελιάς είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, που θα μπορούσαν εν μέρει, να ευθύνονται για την καρδιοπροστατευτική δράση που παρουσιάζεται στην Μεσογειακή διατροφή.

7) Η προστατευτική δράση του ελαιολάδου και των φαινολικών του συστατικών, κατά της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας. (Fito M, et.al. 2000). Εδώ, τα αποτελέσματα έδειξαν πως το παρθένο ελαιόλαδο [0.1-0.3 mg/L caffeic acid equivalents (CAE) - ισοδύναμο καφεϊκού οξέως], που περιέχει πολυφαινόλες, έχει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση, σε σχέση με εκείνη του εξευγενισμένου ελαιολάδου (0 mg/L CAE).

Φαινολικές συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20 mg/L, παρεμπόδισαν την δημιουργία των δραστικών ουσιών από το θειοβαρβιτουρικό οξύ, όταν το AAPH [(2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride), σαν ελεύθερη ρίζα, ξεκίνησε την οξείδωση της LDL.

8) Ελαιόλαδο και αναστολή της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας. Ο ρόλος των φαινολικών συστατικών. (Fito M, et.al. 2000). Ο σκοπός της εργασίας ήταν να ερευνηθεί η προστατευτική επίδραση των ελαιολάδων, με διαφορετική φαινολική σύσταση, κατά της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας. Χρησιμοποιήθηκαν:

- Εξευγενισμένο ελαιόλαδο, με φαινολικό περιεχόμενο: 0 mg/l CAE),
- Κοινό ελαιόλαδο (0.1 - 0.3 mg/l CAE) και

- Παρθένο ελαιόλαδο, αραιωμένο με εξευγενισμένο ελαιόλαδο .

Η υδροξυτυροσώλη και η ελευρωπαΐνη, αναστέλλουν την οξειδωση της LDL, που προκαλείται από θεϊκό χαλκό (CuSO_4). Ο θεϊκός χαλκός, μειώνει ταχύτητα την αντιοξειδωτική ικανότητα της βιταμίνης E, στην LDL. (Afanas IB, 1985). Τα λιπαρά οξέα που προσβάλλονται από την επίδραση του θεϊκού χαλκού είναι κυρίως τα πολυακόρεστα (λινολεϊκό, αραχιδονικό και εικοσαπεντοϊκό), που είναι περισσότερο ευπαθή στην οξείδωση. Η υδροξυτυροσώλη και η ελευρωπαΐνη, μπορούν να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες ή να δρουν σαν παράγοντες χηλικοποίησης, διακόπτοντας έτσι την αλυσίδα του πολλαπλασιασμού των υπεροξειδίων. Μετά από πολλαπλές αναλύσεις, τα απότελέσματα έδειξαν πως οι πολυφαινόλες που περιέχονται στο παρθένο ελαιόλαδο, επιδεικνύουν μεγαλύτερο αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα, στην οξείδωση της LDL, σε σχέση με το εξευγενισμένο ελαιόλαδο.

9). Αντιθρομβωτικές δυνατότητες του ελαιολάδου σε κουνέλια με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης. (De La Cruz JP, et.al. 2000). Ο αντικειμενικός σκοπός αυτής της μελέτης, ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση των διατροφικών συμπληρωμάτων με παρθένο ελαιόλαδο, σε ένα πειραματικό μοντέλο με κουνέλια που τρέφονταν με μία συγκεκριμένη δίαιτα (κορεσμένα λιπαρά 48% των συνολικών λιπαρών).

Μελετήθηκαν, τέσσερις (4) διαφορετικές ομάδες των 10 ζώων η κάθε μία ως εξής:

- Η πρώτη ομάδα τράφηκε, με μία εμπορική τυποποιημένη δίαιτα.
- Η δεύτερη ομάδα τράφηκε, με μία τυπική δίαιτα, συμπληρωμένη από 1% χοληστερόλη και υψηλά κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.
- Η τρίτη ομάδα τράφηκε, ακριβώς με την δίαιτα της πρώτης ομάδας, εμπλουτισμένη όμως κατά 15% σε ελαιόλαδο και
- Η τέταρτη ομάδα τράφηκε, ακριβώς με την δίαιτα της δεύτερης ομάδας, εμπλουτισμένη όμως κατά 15% σε παρθένο ελαιόλαδο.

Τελικά, η διαιτητική συμπλήρωση με ελαιόλαδο, σε κουνέλια που τρέφονταν προηγουμένως με τις εμπορικές – τυποποιημένες δίαιτες, μείωσε

την προθρομβωτική δραστηριότητα. Στα αιμοπετάλια βρέθηκαν μειώσεις στη συσσωμάτωση, στη σύνθεση θρομβοξανθής, και στον σχηματισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Στο αρτηριακό τοίχωμα, βρέθηκε μειωμένη θρομβογονικότητα του υποενδοθηλίου και αυξημένη αντιθρομβωτική δράση στο ενδοθήλιο [δηλαδή, αυξημένη σύνθεση προστακυκλίνης (λιπιδικό μόριο – εικοσανοειδές) και μειωμένος σχηματισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης].

10) Επίδραση των φαινολικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου, στην οξείδωση των ανθρώπινων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, στο εργαστήριο. (Caruso D, et.al. 1999). Η εργασία αναφέρει ότι τα μέχρι τώρα στοιχεία, δείχνουν ότι οι οξειδωμένες χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) συμπράτουν στην παθογένεση και την εξέλιξη της ανθρώπινης αρτηριοσκλήρυνσης. Η οξειδωμένη LDL (oxLDL) είναι παρούσα σε αθηρωματικές πλάκες και περιέχουν οξυστερόλες, που παρουσιάζουν μια ποικιλία ανεπιθύμητων βιολογικών δραστηριοτήτων.

Τα αντιοξειδωτικά, έχουν επίσης αποδειχθεί ότι προλαμβάνουν την τροποποίηση LDL. Εκτελέστηκε αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των φαινολικών ενώσεων από παρθένο ελαιόλαδο στην πρόληψη της οξείδωσης της ανθρώπινης LDL, η οποία οξειδώνεται από υπεριώδες φως.

Τα οξείδια της χοληστερόλης, που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια LDL φωτο-οξείδωσης, προσδιορίστηκαν με UV-HPLC, υπό την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των φαινολικών ενώσεων με τα καθαρά συστατικά τους (τυροσόλη, ελευρωπαΐνη) και προβουκόλη, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο συνθετικό αντιοξειδωτικό. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα μετρήθηκε επίσης. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι φαινολικές ενώσεις είναι πολύ πιο ισχυρές στην πρόληψη της σχηματισμού οξειδίου της χοληστερόλης.

11) Αναστολή των λευκοκυττάρων 5-λιποξυγενάσης από φαινόλες του παρθένου ελαιόλαδου. (de la Puerta R, et.al. 1999). Σε αυτήν την εργασία, απομονώθηκαν λευκοκύτταρα αρουραίου και εκτελέστηκε το πειραματικό πλάνο. Διοχετεύθηκε στα κύτταρα PMA (phorbol myristate acetate - Οξική μυριστική φορβόλη), με αποτέλεσμα την δημιουργία μίας μεγάλης αναπνευστικής κυτταρικής δραστηριότητας και φυσικά την δημιουργία ανιόντων υπεροξειδίου και άλλων προϊόντων. Διαπιστώθηκε πως η υδροξυτυροσόλη, το καφεϊκό οξύ, η ελευρωπαΐνη και η τυροσόλη έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ή να μειώνουν την παραγωγή των ROS.

12) Αναστολή της δραστηριότητας της αραχιδονικής λιποξυγενάσης, από την Υδροξυτυροσόλη, ένα φαινολικό συστατικό του ελαιόλαδου. (Kohyama N, et.al, 1997). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι λιποξυγενάσες, είναι ένζυμα που περιέχουν σίδηρο και καταλύουν την διοξυγέννεση (επιταχύνουν την ενσωμάτωση των δύο άτομων του O₂ σε ένα υπόστρωμα), των λιπαρών οξέων στα λιπίδια. Συγκεκριμένα καταλύουν την παρακάτω αντίδραση: (fatty acid + O₂ = fatty acid hydroperoxide). Εδώ, αναφέρεται πως ερευνήθηκαν οι επιδράσεις της ελιάς, στις δραστηριότητες της λιποξυγενάσης του αραχιδονικού οξέως, πάνω σε αιμοπετάλια και πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (PMNL - polymorphonuclear leukocytes) ποντικών. Υπήρξε ισχυρή αναστολή από την Υδροξυτυροσόλη με IC₅₀, 4.2 microM για την δραστηριότητα της 12-lipoxygenase (12-LO) και IC₅₀, 13 microM για την PMNL 5-lipoxygenase (5-LO).

1.6.4.3. Αντιμικροβιακή και Αντι-ϊική Δραστηριότητα.

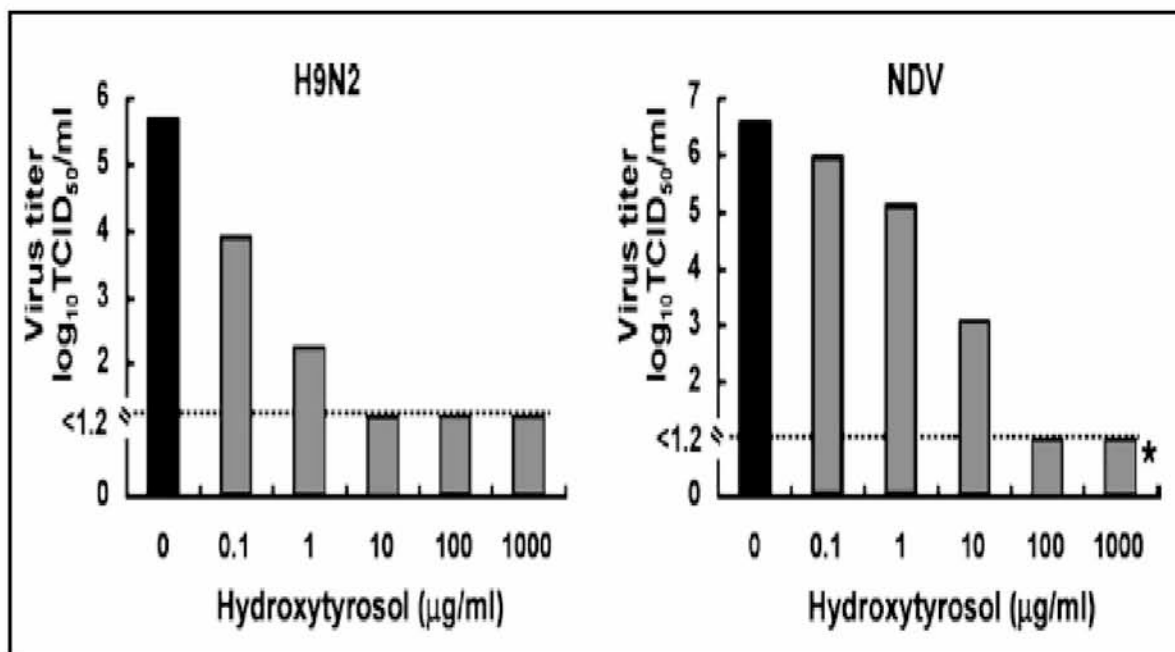
1) Βακτηριοκτόνος δράση της γλουταραλδεϋδης, σε σχέση με τα συστατικά των ελαιοκομικών προϊόντων. (Medina E, et.al. 2009).

Στην παραπάνω μελέτη, εξετάστηκαν κάποια συστατικά του ελαιόλαδου, στην βακτηριοκτόνο δράση (ελευρωπαΐνη, τυροσόλη και η διαλδεϊκή μορφή του δεκαρβοξυμέθυλου ελανολικού οξέως), κατά στελεχών της *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, και *Escherichia coli*.

Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν πως οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου, έχουν μια ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση ακόμη μεγαλύτερη από

εκείνη των άλλων φαινολικών ενώσεων των τροφίμων ή των συνθετικών βιοκτόνων.

2) Ο αντι- ιϊκός μηχανισμός της υδροξυτυροσόλης, στον ιο της γρίπης, φαίνεται να εμπλέκεται στην μορφολογική αλλαγή του ιού. (Yamada K, et.al. 2009).



Γράφημα 5. Σύγκριση των Αντι-ιϊκών Αποτελεσμάτων της Υδροξυτυροσόλης σε Ιούς.

Οι ιοί υποβλήθηκαν σε θεραπεία με διάλυμα υδροξυτυροσόλης, σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Οι μαύρες μπάρες αντιπροσωπεύουν τα control που διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες, απουσία της υδροξυτυροσόλης. Διαπιστώθηκε ότι παρουσία της υδροξυτύροσόλης, ιικοί υπότυποι της γρίπης τύπου Α όπως H1N1, H3N2, H5N1, and H9N2, αδρανοποιούνται.

3) Αντιμικροβιακή δραστηριότητα της Ελευρωπαΐνης και της Υδροξυτυροσόλης. (Bisignano G, et.al. 1999). Σ'αυτήν την εργασία, φαίνεται πως οι βιοφαινόλες (ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη), μπορεί να θεωρηθούν ως αντιμικροβιακά συστατικά, έναντι των παθογενών βακτηρίων. Εξετάσθηκαν 44 κλινικά απομονωμένα βακτήρια, σε πολλές δοκιμές που εκτελέστηκαν. Τελικά, φάνηκε πως και οι δύο αυτές πολυφαινόλες, εισέρχονται στις διαφορετικά δομημένες κυτταρικές μεμβράνες, των Gram-

αρνητικών και Gram Θετικών βακτηρίων, με την υδροξυτυροσώλη να φαίνεται πιο δραστική. Μερικά από τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Γένος ATCC = <i>American Type Culture Collection.</i>	Ελάχιστη Συγκέντρωση Αναστολής (mg/ml)		
	Oleuropein	Hydroxytyrosol	Ampicillin
Haemophilus influenzae ATCC 9006	500	0~97	1~91
Moraxella catarrhalis ATCC 8176	> 500	1~92	0~48
Salmonella typhi ATCC 6539	125	3~94	1~93
Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802	62~5	0~24	3~90
Staphylococcus aureus ATCC 25923	62~5	7~85	0~48

Πίνακας 10. Ελάχιστες Συγκέντρωσεις Αναστολής της Ελευρωπαΐνης και Υδροξυτυροσώλης, κατά των Βακτηρίων. (Η Αμπικικιλίνη Χρησιμοποιείται ως Σημείο Αναφοράς).

4) Αντιβακτηριακές πολυφαινόλες από τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Capasso R, et.al. 1995). Αυτή η μελέτη υποστηρίζει πως τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων, ήταν ιδιαίτερα τοξικά σε φυτοπαθογόνα Gram-αρνητικά (*Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*) και Gram-θετικά (*Corynebacterium michiganense*) βακτήρια και έδειξε βακτηριοκτόνο δράση στην αρχική τους συγκέντρωση (σε ακατέργαστη μορφή). Μεταξύ των κύριων πολυφαινόλων, που υπάρχουν στα λύματα, η μεθυλκατεχόλη αποδείχθηκε να είναι η πιο τοξική για *Ps. savastanoi* σε $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.

Αναφέρονται επίσης και μερικές άλλης μελέτες που αφορούν στις αντιμικροβιακές δυνατότητες των πολυφαινολών όπως ή αντιμικροβιακή δραστικότητα και αναστολή του σχηματισμού αφλατοξίνης B1 από συστατικά του φυτικού ιστού της ελιάς. (Paster N, et.al. 1988), η παρασκευή αντιμικροβιακών συστατικών από την ελερωπαΐνη, από τα φύλλα της ελιάς (Walter WM Jr, et.al. 1973) και οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυσικών φαινολών και οι σχετικές ενώσεις (Jurd L, et.al. 1971).

1.6.4.4. Καρκίνος.

1). Οι πολυφαινόλες της Μεσογειακής δίαιτας μειώνουν την φλεγμονώδη αγγειογένεση μέσω αναστολής των MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase 9* – μεταλλοπρωτεΐνες, μία ομάδα ενζύμων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ύλης) και COX-2 (*Cyclooxygenase 2* - Κυκλοοξυγενάση - πρωτεΐνη που η υπερέκφρασή της εμπλέκεται σε ασθένειες), σε ανθρώπινα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα: Ένας δυνητικά προστατευτικός μηχανισμός στην αθηροσκλήρωση και στον καρκίνο. (Scoditti, E., 2012). Η φλεγμονώδης αγγειογένεση είναι μία βασική παθογόνος διαδικασία τόσο στον καρκίνο όσο και στην αθηροσκλήρωση, και ρυθμίζεται στενά από το ενζύμο COX-2 και τις μεταλλοπρωτεΐνες. Έγινε μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών ελερωπαΐνης και υδροxyτυροσόλης από το ελαιόλαδο, της ρεσβερατρόλης και της κερκετίνης από το κόκκινο κρασί, πάνω στην αγγειογόνο απόκριση, σε ενδοθηλιακά κύτταρα, έτσι ώστε να διερευνηθούν οι μηχανισμοί δράσης των πολυφαινολών. Καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα προ-επώαστηκαν με 0,1 έως 50 $\mu\text{mol} / \text{L}$ πολυφαινολών, πριν από τη διέγερσή τους με οξική μυριστική φορβόλη (PMA). Όλες οι πολυφαινόλες, μείωσαν την εκφύλιση των ενδοθηλίων κυττάρων (ποροειδείς αυλοί).

2) Η πρόληψη του καρκίνου στην Ευρώπη: Η μεσογειακή δίαιτα ως προστατευτική επιλογή. (Giacosa A., et.al. 2012). Η μελέτη αναφέρει αρχικά πως αν και περισσότερο από το 40% των θανάτων από καρκίνο μπορεί να προληφθεί, ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη πιο σημαντική αιτία θανάτου και νοσηρότητας στην Ευρώπη, με περισσότερα από τρία εκατομμύρια νέες περιπτώσεις και 1,7 εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο. Ένα υγιές μοντέλο

διατροφής στις χώρες της Ευρώπης, είναι η παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή, η οποία βασίζεται στην πλούσια ποικιλία των φυτικών τροφών, στην υψηλή κατανάλωση δημητριακών, στο ελαιόλαδο, στην χαμηλή κατανάλωση κρέατος και στην μέτρια κατανάλωση κρασιού. Η κεντρική ιδέα έχει ως εξής:

- Η μεσογειακή διατροφή συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου.

- Αν η Μεσογειακή δίαιτα εισαχθεί σε χώρες με την τυπική δυτική δίαιτα, ο συνολικός κίνδυνος του καρκίνου θα μπορούσε να μειωθεί κατά 10% και ειδικότερα ο κίνδυνος του ορθοκολικού και άλλων καρκίνων του πεπτικού συστήματος μπορεί να μειωθεί έως και 25%.

- Οι βιολογικοί μηχανισμοί για την πρόληψη του καρκίνου που σχετίζονται με τη μεσογειακή διατροφή έχουν σχέση με μια ισορροπημένη αναλογία των ωμέγα-6 και ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και στις υψηλές ποσότητες φυτικών ινών, αντιοξειδωτικών και πολυφαινολών που βρίσκονται στα φρούτα, λαχανικά, ελαιόλαδο και κρασί.

Ήδη, μετά την αναφορά στις παραπάνω μελέτες, φαίνεται η σπουδαιότητα και η πολυδιάστατη δράση των πολυφαινολών του ελαιολάδου. Πρέπει όμως να αναφερθούν και άλλα πεδία της βιοδραστικότητας αυτών που είναι:

- Η προστασία του νευρικού συστήματος.
- Η προώθηση της βιογένεσης των μιτοχονδρίων.
- Η υγεία του δέρματος.

1.7. Σκοπός.

Η παρούσα εργασία, είχε σαν σκοπό την απομόνωση – επεξεργασία πολυφαινολικών συστατικών, σε μορφή υγρού εκχυλίσματος και σκόνης, υψηλής προστιθέμενης αξίας, από τα απόβλητα ελαιοτριβείου, καθώς και στον έλεγχο της αντιοξειδωτικής τους δράσης, έτσι ώστε, με την κατάλληλη προσθήκη αυτών σε ποτό, τρόφιμο ή φαρμακευτικό σκεύασμα, να προσδίδονται οι θετικές ιδιότητες του ελαιολάδου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.

2.1. Γενικά.

Εκτελέστηκαν εργασίες που αφορούσαν στην εξαγωγή υλικού σε υγρή μορφή, πλούσιο σε πολυφαινολικά συστατικά, από αποβλήτα ελαιοτριβείου, καθώς επίσης και η ενθυλάκωση του υλικού αυτού και η παραγωγή σκόνης που περιέχει τις ευεργετικές πολυφαινολικές ιδιότητες. Παράλληλα, στα υγρά και στερεά δείγματα, εκτελέστηκε ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης, με την χρήση των μεθόδων DPPH και ABTS.

2.2. Ιστορικό.

Από τα μέσα Μαρτίου του 2012, μέχρι και τον Σεπτέμβριο του ιδίου έτους, εκτελέστηκαν τα παρακάτω:

α. Στο εργαστήριο της Μηχανικής Τροφίμων και Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας:

- Χημική ανάλυση του υγρού φυσικού αντιοξειδωτικού, που προέρχεται από επεξεργασμένα υγρά αποβλήτα ελαιοτριβείου (24 Brix). (ΤΕΙ / Αθήνας).

- Λειτουργία πειραματικού δακτυλίου, για υπερδιήθηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, με μεμβράνες 2.000 και 8.000 Da.

- Εφαρμογή επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, σε ακίδα υπερήχων.

- Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying) και ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying), για παραλαβή σκόνης με πολυφαινολικό περιεχόμενο.

β. Στο εργαστήριο της Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας:

- Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας, μεγάλου όγκου δειγμάτων σε στερεά και υγρή μορφή, με τις μεθόδους DPPH και ABTS.

- 1) Δεκαοκτώ (18), από τα στάδια της επεξεργασίας.

- 2) Δέκα (10), που εκτέθηκαν στην ακίδα υπερήχων.

- 3) Επτά (7), από την υπερδιήθηση σε 2.000 και 8.000 Da.

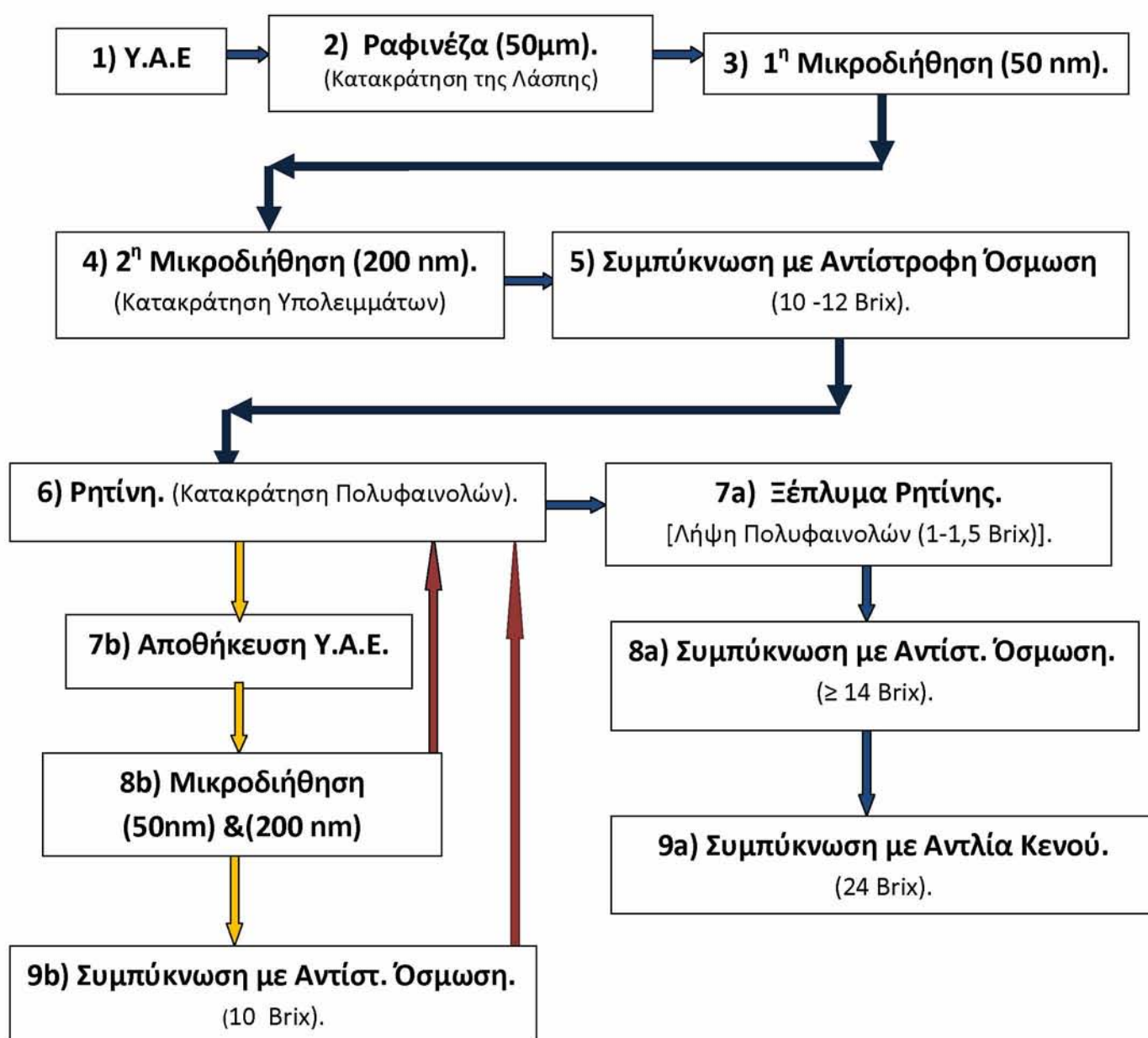
- 4) Δεκατρία (13), από spray drying.

- 5) Τρία (3), από freeze drying.

- Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας, σε όξινο pH=2, προσομοιάζοντας το γαστρικό υγρό, σε σχέση με την πάροδο του χρόνου.

2.3. Επεξεργασία Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου.

Παρουσιάζεται διαγραμματικά η πατενταρισμένη διαδικασία επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων, από την εταιρεία Polyhealth, με έδρα την Λάρισα, για την λήψη πολυφαινολικού υγρού.



Γράφημα 6. Επεξεργασία Υγρών Αποβλήτων.

2.4. Κωδικοποίηση Σταδίων Επεξεργασίας Υ.Α.Ε.

Με σκοπό, την άμεση ερμηνεία των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής δράσης, των δειγμάτων που ελήφθησαν από τα διάφορα στάδια της επεξεργασίας, δημιουργήθηκε ο παρακάτω πίνακας.

Κώδικας	ΣΤΑΔΙΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ
1	ΑΡΧΙΚΟ ΑΠΟΒΛΗΤΟ (ΧΩΡΙΣ ΚΑΜΜΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ).
2	ΡΑΦΙΝΕΖΑ (50 μm). ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗ ΛΑΣΠΗΣ.
3	1 ^Η ΜΙΚΡΟΔΙΗΘΗΣΗ (50 nm).
4	2 ^Η ΜΙΚΡΟΔΙΗΘΗΣΗ (200 nm). ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.
5	ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΟΣΜΩΣΗ.
6	ΡΗΤΙΝΗ (ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ).
7a	ΞΕΠΛΥΜΑ ΡΗΤΙΝΗΣ (ΛΗΨΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ).
7b	ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΩΝ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ.
8a	ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΟΣΜΩΣΗ.
8b	ΜΙΚΡΟΔΙΗΘΗΣΗ (50 & 200 nm).
9a	ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΜΕ ΑΝΤΛΙΑ ΚΕΝΟΥ
9b	ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΟΣΜΩΣΗ.

Πίνακας 9. Κωδικοποίηση Σταδίων Επεξεργασίας.

2.5. Μέθοδοι Εκτίμησης της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας των Πολυφαινολών από Απόβλητα Ελαιοτριβείου.

2.5.1. Γενικά.

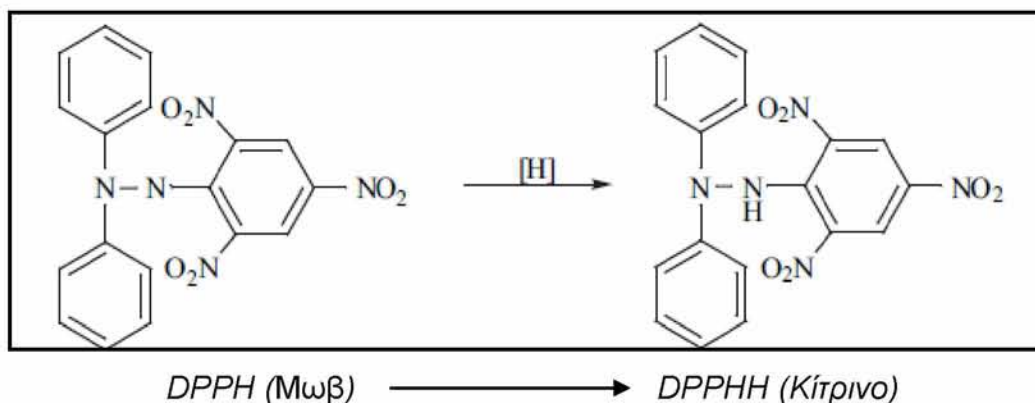
Για την εκτίμηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (*Total Antioxidant Activity*) των εκχυλισμάτων, εφαρμόστηκαν κάποιες από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Πρόκειται για τις δύο, κατά βάση ποιοτικές *in vitro* μεθόδους (DPPH και ABTS), οι οποίες ανιχνεύουν την αντιοξειδωτική ή μη ικανότητα ενός συγκεκριμένου συστατικού. Και οι δύο μέθοδοι, βασίζονται στον προσδιορισμό της ικανότητας των αντιοξειδωτικών ουσιών να εξουδετερώνουν ρίζες όπως η 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο ή DPPH[•] (Brand-Williams et.al., 1995) και 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ ή ABTS^{•+} (Rice-Evans et.al., 1996). Η ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης του συστατικού επιτεύχθηκε με τον προσδιορισμό του IC₅₀, της συγκέντρωσης δηλαδή στην οποία οι εξεταζόμενες ουσίες προκαλούν την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH[•] ή ABTS^{•+}, κατά 50% (Kaur et al, 2006; Prior et al., 2005; Molyneux, 2004).

2.5.2. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH[•]

2.5.2.1. Αρχή της Μεθόδου.

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand-Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH[•] μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) **ανάγεται**, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται

παρακάτω (Εικόνα 17). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 17. Η Αναγωγή του $DPPH^{\bullet}$ σε $DPPH:H$

2.5.2.2. Πειραματική Διαδικασία.

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα $DPPH^{\bullet}$ την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας $DPPH^{\bullet}$) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 50, 100, 250, 500, 1000 μg/ml). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας, με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11).

Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και $DPPH$ αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες.

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 12). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με

τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα, ενώ το διάλυμα της ρίζας DPPH* σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	1000μl	950μl	900μl	900μl	900μl	950μl	950μl
DPPH*	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 11. Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων

	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 12. Έλεγχος Απορρόφησης της Εξεταζόμενης Ουσίας, σε Μεθανόλη.

2.5.2.3. Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

όπου:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_s: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε

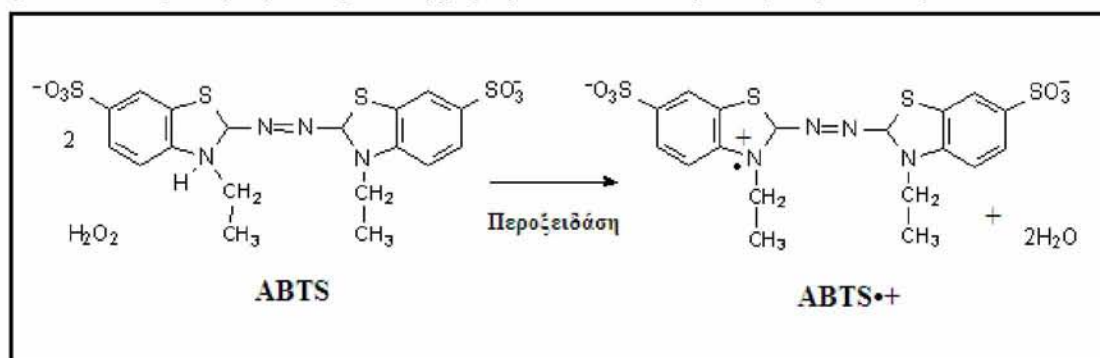
συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0).

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

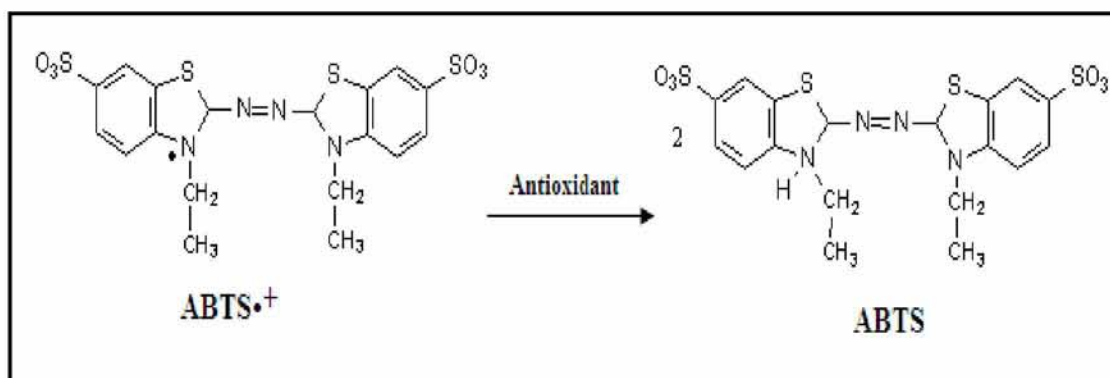
2.5.3. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS^{•+}

2.5.3.1. Αρχή της Μεθόδου.

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εν δυνάμει αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et.al., 1993), και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), **οξειδώνεται** και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS^{•+} (κατιόν) (Εικόνα 18). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.



Εικόνα 18. Η Οξείδωση του ABTS σε Δραστική ρίζα.



Εικόνα 19. Η Αλληλεπίδραση του Αντιοξειδωτικού με την Ρίζα $ABTS^{\bullet+}$

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Εικόνα 19) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999).

2.5.3.2. Πειραματική Διαδικασία.

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$).

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H_2O .

Διάλυμα H_2O_2 (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM . Από το stock διάλυμα H_2O_2 30% 8,8 M αραιώνουμε με H_2O_2 , ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM .

Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/10 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση. Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του

πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 50, 100, 250, 500, 1000 $\mu g/ml$), σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 11). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε εκχύλισμα ενώ το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H_2O_2 , HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm.

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 13).

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
H₂O	450 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ l	400 μ l
ABTS	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ l	500 μ l
H₂O₂	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ l	50 μ l
HRP	-	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50ml	50ml
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1mL	1mL
Επώαση 45 min							

Πίνακας 13: Η Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και Ποσότητες των Αντιδραστηρίων.

	Τυφλό	C1	C2	C3	C4	C5
H ₂ O	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL
ABTS	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
H ₂ O ₂	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Εκχύλισμα	-	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
V τελ	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

Πίνακας 14: Έλεγχος Απορρόφησης Εξεταζόμενης Συγκέντρωσης , Χωρίς την Προσθήκη του Ενζύμου.

2.5.3.3. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση.

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 730nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας ABTS^{•+} και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας ABTS}^{\bullet+} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

όπου: **A₀**: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_s: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (εκχύλισμα).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS^{•+} που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης *r* κατά Spearman.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS^{•+} κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο

μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

2.6. Δείγματοληψία Επεξεργασμένων Υ.Α.Ε.

Εκτελέστηκαν δεκαοκτώ (18), δειγματοληψίες, από τα διάφορα στάδια επεξεργασίας, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

A/A ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΣΤΑΔΙΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ
1	24,1 Brix (Συμπύκνωση με Αντλία Κενού, με Ένα Πέρασμα).
2	24,1 Brix. (Συμπύκνωση με Αντλία Κενού, με Δύο Πέρασματα).
3	16,2 Brix. 8a. (Μετά την Αντίστροφη Όσμωση).
4	13 Brix. 7b-8b-9b-6-7α - 8a. Δεύτερο Πέρασμα μετά την Αποθήκευση (Μικροδιήθηση – Συμπύκνωση με Αντιστροφη Όσμωση – Ξεπλυμα Ρητίνης).
5	12 Brix. 7b-8b-9b-6-7α - 8a.
6	11,5 Brix. 7b-8b-9b-6-7α - 8a.
7	10 Brix. 7b-8b-9b-6-7α - 8a.
8	8 Brix. 7b-8b-9b-6-7α - 8a.
9	6 Brix. 7b-8b-9b-6-7α - 8a.
10	4 Brix. 7b-8b-9b-6-7α - 8a.
11	5,4 Brix. 8b. (Από 1ο Module Μικροδιήθησης 50 nm, αφού εκτελέστηκε μία φορά κατακράτηση Πολυφαινολών).
12	7 Brix. 7b-8b-6-7b. (Τελικό Απόβλητο).
13	5,4 Brix. 8b. (Από 2ο Module Μικροδιήθησης 200 nm, αφού εκτελέστηκε μία φορά κατακράτηση Πολυφαινολών).
14	2 Brix. 7b-8b-9b-6-7α - 8a.
15	3,7 Brix, 7b-8b(50nm)-6-7b (Τελικό Απόβλητο).
16	3,2 Brix. 7b-8b (200 nm)-6-7b (Τελικό Απόβλητο).
17	1, 1 Brix. 7b-8b (50nm)-6-7α.
18	0, 9 Brix. 7b-8b (200 nm)-6-7α.

Πίνακας 15. Δείγματα από Επεξεργασμένα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου.

2.7. Συσκευή Ακίδας Υπερήχων.



Εικόνα 20. SONICATOR® 3000 – ULTRASONIC LIQUID PROCESSOR.

2.7.1. Αρχή Λειτουργίας.

Το τροφοδοτικό της συσκευής της ακίδας υπερήχων, μετατρέπει το εμπορικό εναλασσόμενο ρεύμα των 220 VAC / 50-60 Hz, σε ηλεκτρική ενέργεια των 20 KHz, η οποία μεταφέρεται στον μετατροπέα και εκφράζεται ως μηχανική δόνηση. Η καρδιά του μετατροπέα είναι ένας πιεζοηλεκτρικός κρύσταλλος, που όταν δέχεται ηλεκτρική ενέργεια, διαστέλλεται και συστέλλεται. Αυτός λοιπόν ο μετατροπέας, δονείται κατά μήκος του διαμήκη άξονα, μεταδίδοντας την κίνηση αυτή στην άκρη της ακίδας, η οποία είναι βυθισμένη στο προς επεξεργασία υγρό.

Η δόνηση προκαλεί τη δημιουργία φουσαλίδων αέρος εντός του υγρού και την έκρηξη – το σπάσιμο αυτών, με αποτέλεσμα την συνεχή δημιουργία κρουστικών κυμάτων.

Με αυτήν την ιδέα ενέργειας, η συσκευή μπορεί να:

- Διασπάσει ιστούς, κύτταρα, βακτήρια και σπόρους.
- Επιταχύνει χημικές αντιδράσεις.
- Ομογενοποιήσει μη-αναμίξιμα υγρά.

• Επιτύχει γαλάκτωμα (emulsion - μίγμα δύο ή περισσότερων υγρών τα οποία είναι φυσιολογικά μη αναμίξιμα), με διάμετρο σωματιδίων στο 1/100 του ενός micron.

2.7.2. Διακοπτολογία Συσσκευής Υπερήχων

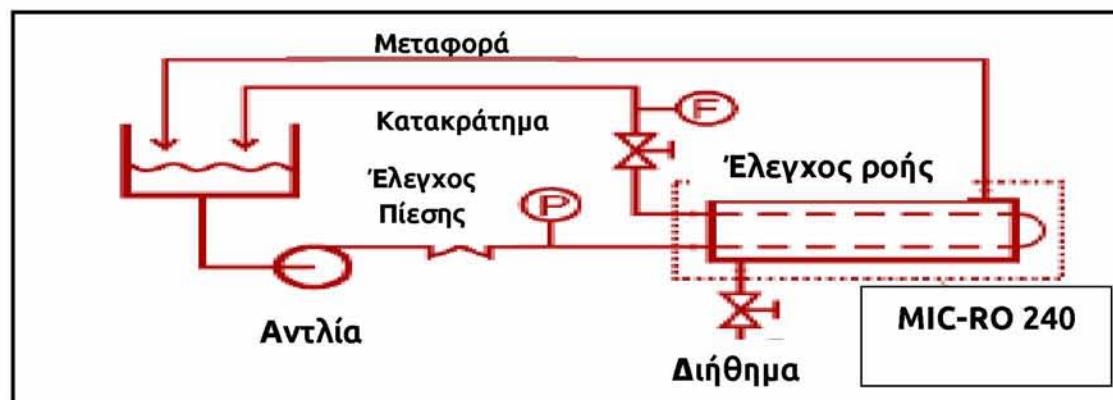
Η διακοπτολογία της συσκευής παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Διακόπτης	Ενέργεια
START	Έναρξη ή Παύση Λειτουργίας. Επαναφέρει (Reset) το Χρονόμετρο στην Λειτουργία του Χρονοδιακόπτη.
STOP	
PROG	Θέτει σε Λειτουργία τον Χρονοδιακόπτη και το πρόγραμμα εισαγωγής στοιχείων (PULSAR™). Απεικονίζει τα στοιχεία εισαγωγής στην οθόνη, κατά την διάρκεια της λειτουργίας.
DATA	
ENTER	Εισαγωγή Στοιχείων κατά την Διάρκεια Λειτουργίας του Προγράμματος. Δίδεται Απάντηση ΝΑΙ, σε Ερώτηση.
YES	
CLEAR	Καθαρίζει Προηγούμενες ή Λανθασμένες Καταχωρήσεις. Έξοδος από τη Λειτουργία Προγραμματισμού. Δίδεται Απάντηση ΟΧΙ, σε Ερώτηση.
NO	
MENU	Στην Απεικόνιση PROGRAM, Επιτρέπει την Πρόσβαση σε Παραμέτρους Προγραμματισμού.
EXIT	
PAUSE	Διακόπτει η Ξεκινά από την Αρχή τον Κύκλο Λειτουργίας.
+/-	Αύξηση ή Μείωση τιμών Θερμοκρασίας.
Numeric Keys	Επιτρέπει την Εισαγωγή Αριθμητικών Δεδομένων και την Επιλογή τής Εκάστοτε Προγραμματισμένης Μνήμης.

Πίνακας 16. Διακοπτολογία Συσσκευής Ακίδας Υπερήχων.

2.8. Υπερδιήθηση σε Πειραματικό Δακτύλιο, με την Χρήση Μεμβρανών 2.000 και 8.000 Dalton.

2.8.1. Πειραματικός Δακτύλιος.



Εικόνα 20. Σχηματική Παράσταση Πειραματικού Δακτυλίου.



Εικόνα 21. Πειραματικός Δακτύλιος. **Εικόνα 22.** Διήθημα – Κατακράτημα.

2.8.2. Υλικά και Μέσα.

1. Δεξαμενή INOX, χωρητικότητας 60 lt.
2. Ανοξείδωτη σερπαντίνα ψύξης – θέρμανσης.
3. Εμβολοφόρος Αντλία CSJ-39AS, υψηλής πίεσης 40 bar.
4. Module μικροδιήθησης MIC-RO 240 της εταιρείας ITT PCI Membranes Ltd. U.K., με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

α) Συνθήκες Λειτουργίας

- Τυπική ροή υγρού (5-50 ml/min).
- Προτεινόμενη πίεση (μέχρι 40 bar).
- Προτεινόμενος κύκλος ροής (30 l/min για υπερδιήθηση, που ισοδυναμούν με 4 m/sec).

Οι καλύτερες συνθήκες λειτουργίας, εξαρτώνται από την εκάστοτε εφαρμογή και φυσικά από τον τύπο της μεμβράνης.

β) Τεχνικά Χαρακτηριστικά.

- Δύο (2) θέσεις υποδοχής μεμβρανών με διάμετρο 1,25 cm, που συνδέονται σε σειρά.
- Επιφάνεια υποδοχής μεμβράνης (240 cm²).
- Όγκος μεταφερόμενου υγρού εντός του module (750 ml).
- Μέγιστη πίεση λειτουργίας (55 bar - 70°C και 70 bar - 20°C).
- Το υλικό είναι από ανοξείδωτο χάλυβα 316, ανθεκτικό στην διάβρωση και καλύμματα από ελαστικό κόμμι νιτριλίου.

5. Μεμβράνες 2.000 Da. (CA2PF) και 8.000 Da. (PU608), της εταιρείας ITT PCI Membranes Ltd. U.K με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

	(CA2PF) 2.000 Da.	(PU608) 8.000 Da.
Υλικό	Οξική κυτταρίνη	Πολυσουλφόνη
Εύρος pH	2 – 7,25	2 – 12
Μέγιστη πίεση (bar)	25	15
Μέγιστη θερμοκρασία (°C)	30	80
Υδροφιλικότητα (1=χαμηλή, 5= υψηλή).	5	2
Μήκος – Διάμετρος (mm)	327 – 13	327 – 13
Περιφέρεια(mm) – Επιφάνεια (m ²)	40,82 – 0,0267	40,82 – 0,0267
Flux	18 kgr*hr/m ²	19 kgr*hr/m ²

6. Αγωγοί – Όργανα (Μανόμετρα γλυκερίνης 0-80 bar. Δύο στην είσοδο και δύο στην έξοδο).

2.8.3. Πειραματική Διαδικασία.

2.8.3.1. Με μεμβράνες 2.000 Da.

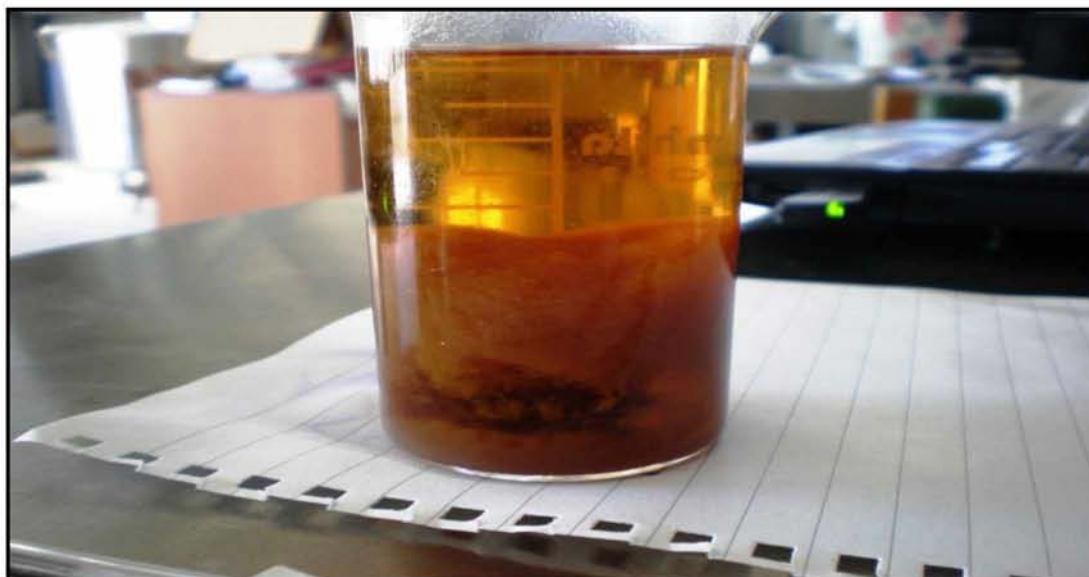
Για το πείραμα, χρησιμοποιήθηκε από τα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου το Δείγμα 2 (24,1 Brix, με IC₅₀ 425 ppm (DPPH) - 220 ppm (ABTS). Έγινε αραίωση 1 προς 10 (2 lt των επεξεργασμένων αποβλήτων σε 20 lt απεσταγμένου νερού). Κατόπιν τέθηκε σε λειτουργία ο πειραματικός δακτύλιος, με πίεση 11 bar στην είσοδο του module και 9 bar στην έξοδο. Μετά από μισή ώρα, ελήφθησαν δύο αρχικά δείγματα. Ένα δείγμα κατακρατήματος, ΑΚ (2,3 Brix) και ένα διηθήματος ΑΔ, (1 Brix). Μετά από εννέα (9) ώρες συνεχούς λειτουργίας, ελήφθησαν τα τελικά δείγματα, αυτό του κατακρατήματος ΤΚ, (2,2 Brix) και του διηθήματος ΤΔ, (1 Brix).

2.8.3.2. Με μεμβράνες 8.000 Da.

Χρησιμοποιήθηκαν επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, από το Δείγμα 2, με προσθήκη ποσότητας νερού, για να πέσουν τα Brix , από 24,1 σε 21,6, με IC₅₀ 590 ppm (DPPH) – 335 ppm (ABTS). Κατόπιν, τέθηκε σε λειτουργία ο πειραματικός δακτύλιος, με τις ίδιες πιέσεις. Μετά από δέκα (10)

ώρες συνεχούς λειτουργίας ελήφθησαν τα τελικά δείγματα, αυτό του κατακρατήματος ΤΚ, (15,6 Brix) και του διηθήματος ΤΔ, (15,3 Brix).

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όταν σε ποσότητα επεξεργασμένων – συμπυκνωμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (21,6 Brix), προστέθηκε μεθανόλη, παρατηρήθηκε καθίζηση των πολυσακχαριτών.



Καθίζηση των Πολυσακχαριτών του Υγρού Αντιοξειδωτικού, μετά από Προσθήκη Μεθανόλης.

2.9. Ξήρανση – Ενθυλάκωση με Ψεκασμό. - Spray Drying.

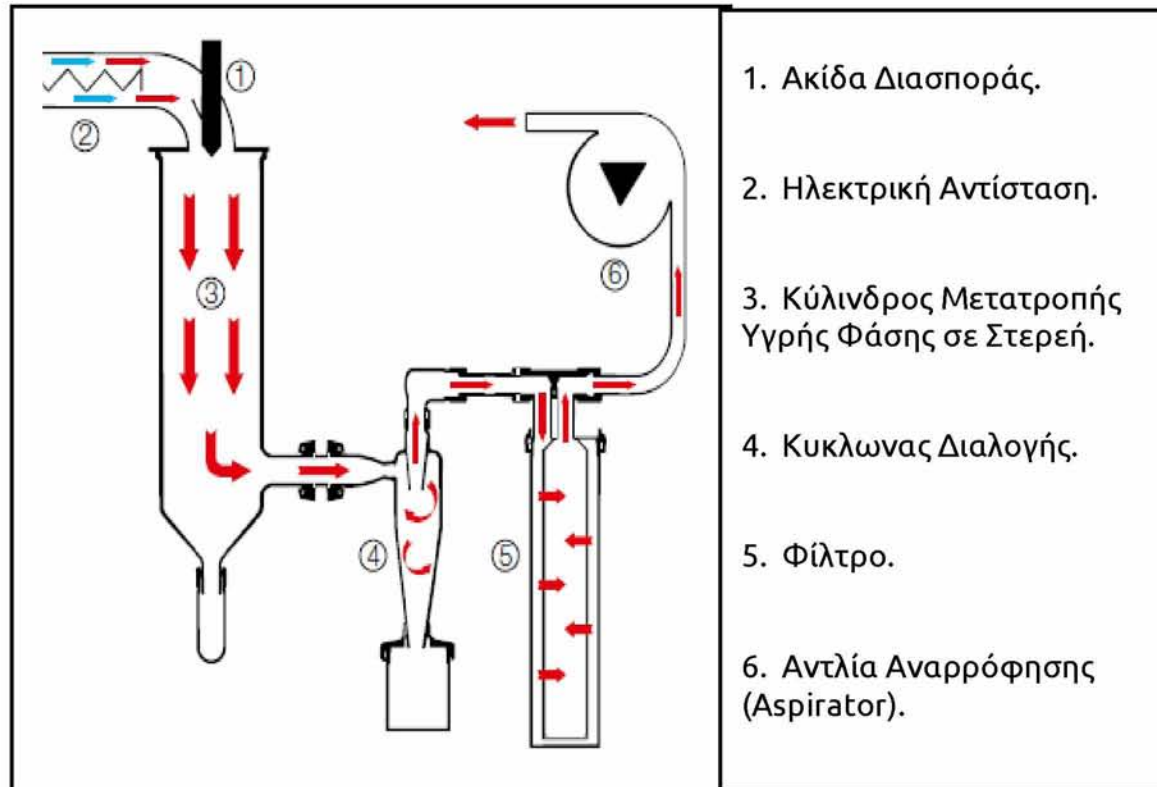
2.9.1. Γενικά.

Η ξήρανση με ψεκασμό, όλων των διαλυμάτων που περιείχαν και τα επεξεργασμένα - (συμπυκνωμένα με αντίστροφη όσμωση – 14,1 Brix), απόβλητα ελαιοτριβείου, εκτελέστηκαν στην συσκευή Mini Spray Dryer B-290, που κατασκευάζεται από την εταιρεία Buchi.

2.9.2. Αρχή Λειτουργίας.

Η λειτουργία περιγράφεται ως εξής: Το προς ξήρανση υγρό μεταφέρεται μέσω αγωγού, προς τον μεγάλο κύλινδρο, με δυνατότητα ελέγχου της ροής του. Πριν την είσοδό του στον κύλινδρο, θερμαίνεται από ηλεκτρική αντίσταση, που βρίσκεται πριν την ακίδα. Η ακίδα η οποία λειτουργεί με συμπιεσμένο αέρα, (μέσω του air compressor), μετατρέπει το διάλυμα σε λεπτά σταγονίδια. Στον μεγάλο κύλινδρο τα σταγονίδια μετατρέπονται σε στερεά σωματίδια. Όσα δεν μετατραπούν, στον πυθμένα εγκλωβίζονται από

μία υγροπαγίδα. Κατόπιν, τα στερεά πλέον σωματίδια μεταφέρονται στον κυκλώνα, όπου γίνεται ο διαχωρισμός. Δηλαδή, στο δοχείο συλογής της ξήρανσης με ψεκασμό, συλλέγονται τα κατάλληλα στερεά σωματίδια, ενώ το υπόλοιπο υλικό περνάει από φίλτρο και μέρος αυτού επανατροφοδοτείται.



Εικόνα 21. Σχηματική Παράσταση Ροής Υλικού στο Spray Dryer.



Εικόνα 22. Spray Dryer B-290 του Εργαστηρίου.

2.9.3. Τεχνικά Χαρακτηριστικά του Mini Spray Dryer B-290.

Ισχύς Λειτουργίας.	2.900 W.
Τάση και Συχνότητα Λειτουργίας.	220/230 V, 50-60 Hz.
Ικανότητα Εξάτμισης.	1,0 l/hr. Υψηλότερη για Οργανικούς Διαλύτες.
Ροή Αέρος.	35 m ³ /hr (max).
Μέγιστη Θερμοκρασία Εισόδου.	220°C.
Αντίσταση Θέρμανσης.	2.300 W.
Αέριο Ψεκασμού.	Συμπιεσμένος Αέρας ή Άζωτο 200 – 1000 l/hr , 5 – 8 bar.
Διάμετρος Ακίδας	0,7 mm.
Διάμετρος Σωματιδίων	1 – 25 µm.
Υλικά που Έρχονται σε Επαφή με το Προϊόν.	Ανοξείδωτος Χάλυβας Ανθεκτικός στην Οξείδωση. Βοριοπυριτικό Γυαλί με Πολύ Μικρό Συντελεστή Θερμικής Διαστολής. FPM (Fluoropolymer – Φθοροπολυμερή), τα οποία Χρησιμοποιούνται στις Βαλβίδες για την Μεταφορά των Βιομηχανικών Υγρών.

Πίνακας 17. Τεχνικά Χαρακτηριστικά του Mini Spray Dryer B-290.

2.9.4. Επεξεργασία Υγρών Διαλυμάτων στο Spray Dryer.

Εκτελέστηκε ξήρανση δεκατριών (13), διαλυμάτων, όγκου 500 ml, που περιήχαν εκτός των άλλων, επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, 14,1 Brix., τα οποία ελήφθησαν κατά το στάδιο, μετά την αντίστροφη όσμωση.

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά, όλα τα στοιχεία:

A/A ΔΕΙΓΜ .	ΕΙΣΟΔΟΣ ΥΓΡΟΥ.	ΕΞΟΔΟΣ ΣΚΟΝΗ (gr)	INLET (°C)	OUTLET (°C)	PUMP (%)	NOZZLE CLEANER
1	375 ml Νερό -75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	54,90	120	77	10	6
2	375 ml Νερό -75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	38,20	120	82	20	5
3	375 ml Νερό - 75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη	11,00	120	74	5	5
4	375 ml Νερό - 75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	21,90	130	76	5	5
5	375 ml Νερό -75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	13,90	160	94	5	5
6	375 ml Νερό - 75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	6,20	160	84	20	6
7	375 ml Νερό - 75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	20,60	100	64	5	6
8	375 ml Νερό - 75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη- 300 ml Αλκοόλης.	52,40	120	80	5	6
9	375 ml Νερό - 75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Πρωτ. Τυρογάλ.	54,40	100	69	5	6
10	370 ml Νερό - 75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνης- 5 gr. Πρωτ. Τυρογ.	43,40	120	74	5	6
11	370 ml Νερό -75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)-50 gr. Μαλτοδεξ. - 5 gr. Πρωτ. Τυρογ.- 300ml Ethanol	54,90	120	78	5	6
12	370 ml Νερό - 75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη - 5 gr. Πρωτ. Τυρογ.	33,70	100	68	5	6
13	365 ml Νερό - 75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξ. - 10 gr Ζελατίνης	54,80	120	79	5	6

Πίνακας 18. Συγκεντρωτικά Στοιχεία Πειραμάτων με το Spray Dryer.

2.10. Κρυοξήρανση – Ενθυλάκωση με Freeze Drying.

2.10.1. Γενικά.

Η κρυοξήρανση ή λυοφιλοποίηση είναι μία μέθοδος αφυδάτωσης, που χρησιμοποιείται συνήθως για την διατήρηση ευαίσθητων υλικών ή να τα καταστήσει ικανά, για πιο ασφαλή μεταφορά. (Jennings A., 1999). Χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση του πλάσματος του αίματος, χωρίς την ανάγκη ψύξης και την παραγωγή στιγμιαίου καφέ.

Από τότε, η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί για τη διατήρηση εκατοντάδων διαφορετικών ειδών τροφίμων και φαρμάκων. Τα λυοφιλιωμένα προϊόντα έχουν μακρά διάρκεια ζωής: σε σφραγισμένη συσκευασία που προστατεύονται από την υγρασία, το φως και το οξυγόνο, μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου για πολλά χρόνια. Η ξήρανση των διαλυμάτων και η λήψη των δειγμάτων, σε μορφή σκόνης, για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκτελέστηκε στην συσκευή *Freeze Dryer*, *CoolSafe*, με κατασκευάστρια εταιρεία την SCANVAC, από την Δανία.



Εικόνα 23. Η Συσκευή *Freeze Dryer* που Χρησιμοποιήθηκε, για την Παρασκευή των Δειγμάτων.

2.10.2. Αρχή Λειτουργίας.

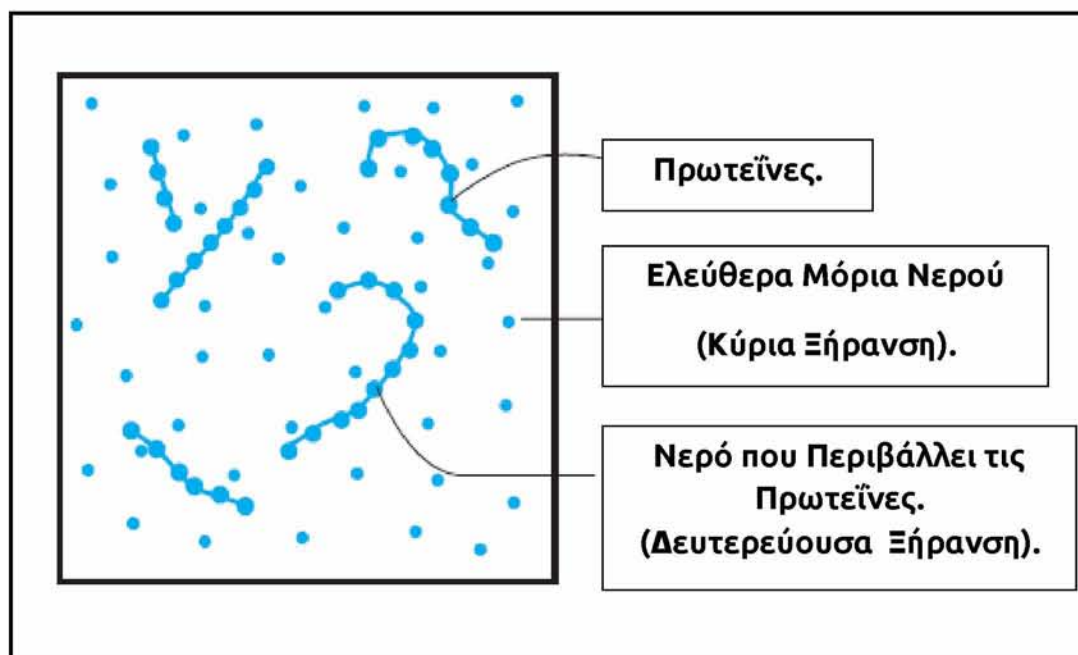
Η λειτουργία περιγράφεται ως εξής: Κατεβάζοντας σε μεγάλο βαθμό την θερμοκρασία (-110°C) και ελαττώνοντας την πίεση που περιβάλλει το υλικό, με την βοήθεια αντλίας, το νερό που βρίσκεται στο υλικό, από την στερεά φάση, μεταβαίνει στην αέρια φάση. Η λυοφιλίωση μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, της τάξεως του 1-4%, προλαμβάνοντας την ανάπτυξη βακτηρίων και μούχλας, αλλά και τη δράση των ενζύμων από το να προκαλέσουν χημικές αντιδράσεις αλλοίωσης στο προς ξήρανση υλικό. Ο κατασκευαστής περιγράφει τέσσερα (4) στάδια στο *Freeze Drying*.

α) Πριν την Ξήρανση. (*Pre – Freeze step*).

β) Δημιουργία Κενού. (*Vacuum step*). Εδώ, αφαιρείται ο αέρας και έτσι μειώνεται η πίεση στο σύστημα.

γ) Κύρια Ξήρανση. (*Primary Drying step*). Το νερό μετακινείται από το προϊόν, σε χαμηλή θερμοκρασία και πίεση, ρέοντας στο σύστημα σαν ατμός (εξάχνωση), προς τον συμπυκνωτή.

δ) Δευτερεύουσα Ξήρανση. (*Secontary Drying step*). Αφαιρείται και το νερό που περιβάλλει τις πρωτεΐνες.



Εικόνα 23. Αφαίρεση Νερού από το Freeze Dryer.

2.11. Μέτρηση Αντιοξειδωτικής Δράσης σε Όξινο pH, Σκόνης που Προήλθε από το Spray Dryer.

Εκτελέστηκε δοκιμή μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, με την μέθοδο DPPH, του δείγματος Νο1, από το Spray Dryer [σκόνη ενθυλακωμένης πολυφαινόλης που προήλθε από, 375 ml Νερό -75 ml ΥΑΕ (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη], σε όξινο pH= 2, προσομοιάζοντας το ανθρώπινο στομάχι. Οι χρόνοι των μετρήσεων ήταν:

- Λήψη δείγματος σε μηδενικό χρόνο.
- Μετά από τριάντα (30) λεπτά της ώρας.
- Μετά από μία (1) ώρα.
- Μετά από δύο (2) ώρες.
- Μετά από τρεις (3) ώρες
- Μετά από τέσσερις (4) ώρες.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

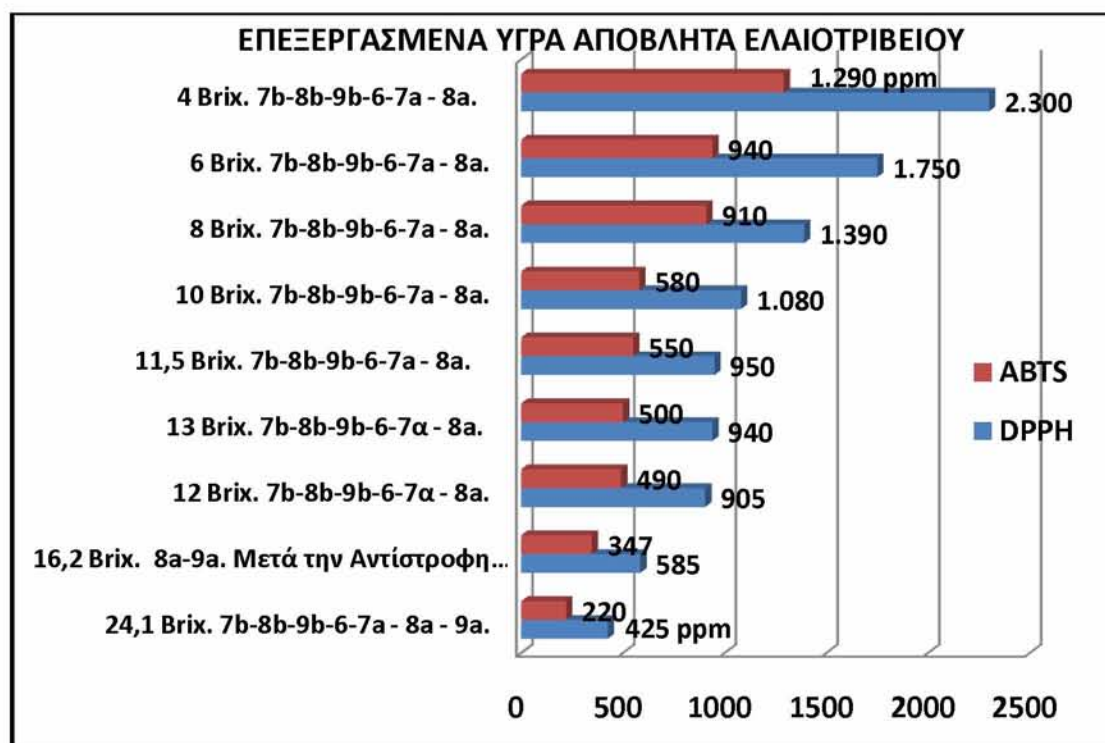
3.1. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας των Επεξεργασμένων Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου, μέσω της Αλληλεπίδρασης με τις Ρίζες DPPH• και ABTS^{•+}.

Συνολικά μελετήθηκαν 18 δείγματα, σε συγκεντρώσεις 100, 250, 500, 1000, 2500 και 5.000 ppm. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων (IC₅₀) και το στάδιο επεξεργασίας κάθε δείγματος.

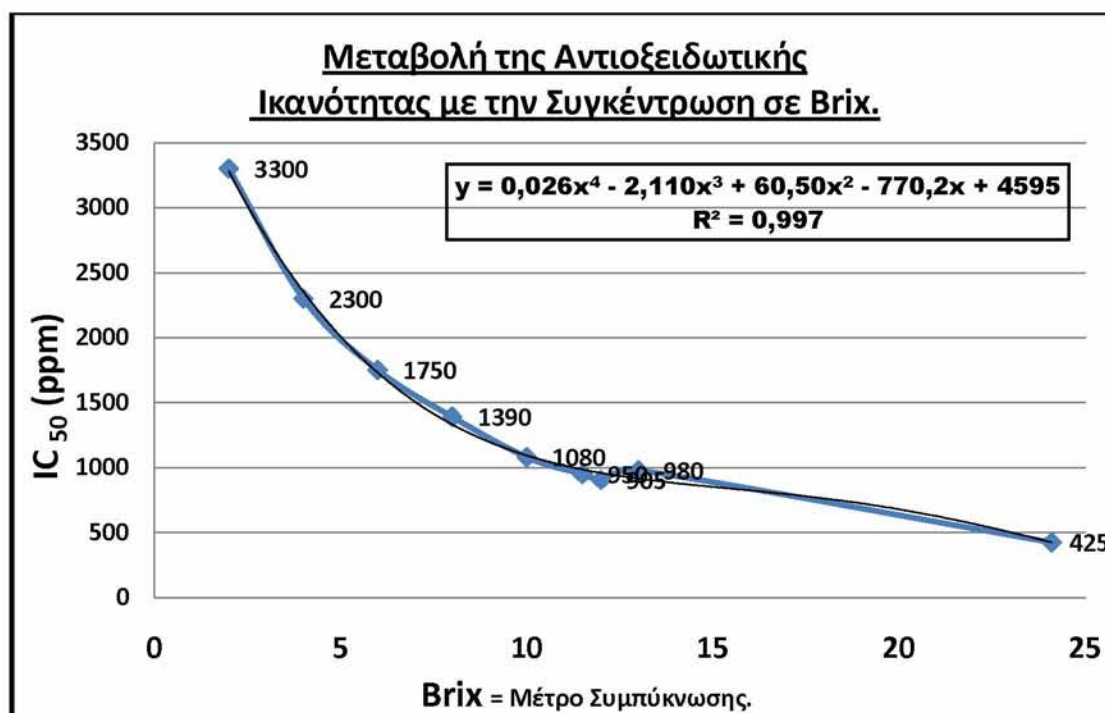
Α/Α	ΣΤΑΔΙΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	IC ₅₀ (ppm)	
		DPPH	ABTS
1	24,1 Brix. (Συμπύκνωση με Αντλία Κενού, με Ένα Πέρασμα).	790	475
2	24,1 Brix. (Συμπύκνωση με Αντλία Κενού, με Δύο Περσματα).	425	220
3	16,2 Brix. 8a. (Μετά την Αντίστροφη Όσμωση).	585	350
4	13 Brix. 7b-8b-9b-6-7a - 8a. Δεύτερο Πέρασμα μετά την Αποθήκευση (Μικροδιήθηση – Συμπύκνωση με Αντιστροφή Όσμωση – Ξεπλυμα Ρητίνης).	905	490
5	12 Brix. 7b-8b-9b-6-7a - 8a.	940	500
6	11,5 Brix. 7b-8b-9b-6-7a - 8a.	950	550
7	10 Brix. 7b-8b-9b-6-7a - 8a.	1.080	580
8	8 Brix. 7b-8b-9b-6-7a - 8a.	1.690	910
9	6 Brix. 7b-8b-9b-6-7a - 8a.	1.750	940
10	4 Brix. 7b-8b-9b-6-7a - 8a.	2.300	1.290
11	5,4 Brix. 8b. (Από 1ο Module Μικροδιήθησης 50 nm, αφού εκτελέστηκε μία φορά κατακράτηση Πολυφαινολών).	2.300	1.360
12	7 Brix. 7b-8b-6-7b. (Τελικό Απόβλητο).	2.650	1420
13	5,4 Brix. 8b. (Από 2ο Module Μικροδιήθησης 200 nm, αφού εκτελέστηκε μία φορά κατακράτηση Πολυφαινολών).	2.840	1.650
14	2 Brix. 7b-8b-9b-6-7a - 8a.	3.300	1.860
15	3,7 Brix. 7b-8b(50nm)-6-7b (Τελικό Απόβλητο).	4.400	2.550
16	3,2 Brix. 7b-8b (200 nm)-6-7b (Τελικό Απόβλητο).	13.400	7.700
17	1, 1 Brix. 7b-8b (50nm)-6-7a.	17.500	10.250
18	0, 9 Brix. 7b-8b (200 nm)-6-7a.	21.000	12.100

Πίνακας 19. Τιμές (IC₅₀), των Επεξεργασμένων Υγρών Αποβλήτων.

Στο παρακάτω γράφημα, παρουσιάζονται οι τιμές (IC_{50}), των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, με τιμές πάνω από 4 Brix.

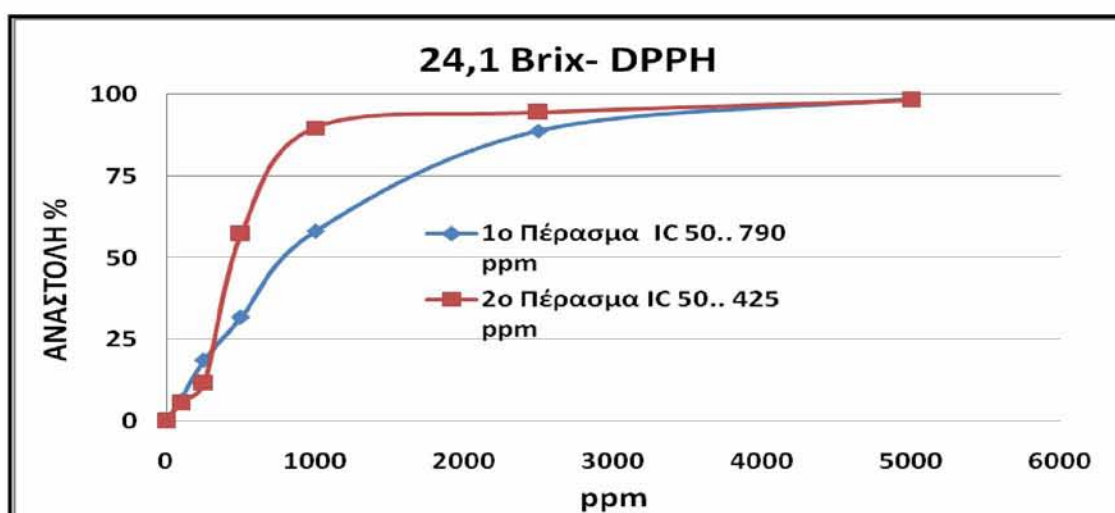


Γράφημα 7. Τιμές (IC_{50}), των Επεξεργασμένων Υγρών Αποβλήτων.

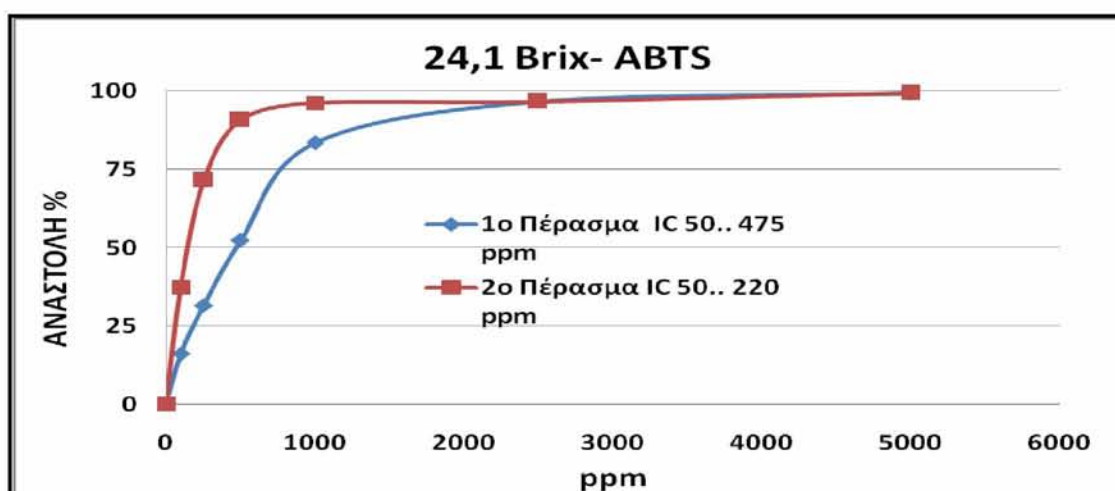


Γράφημα 8. Μεταβολή Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (IC_{50}), σε σχέση με τα Brix.

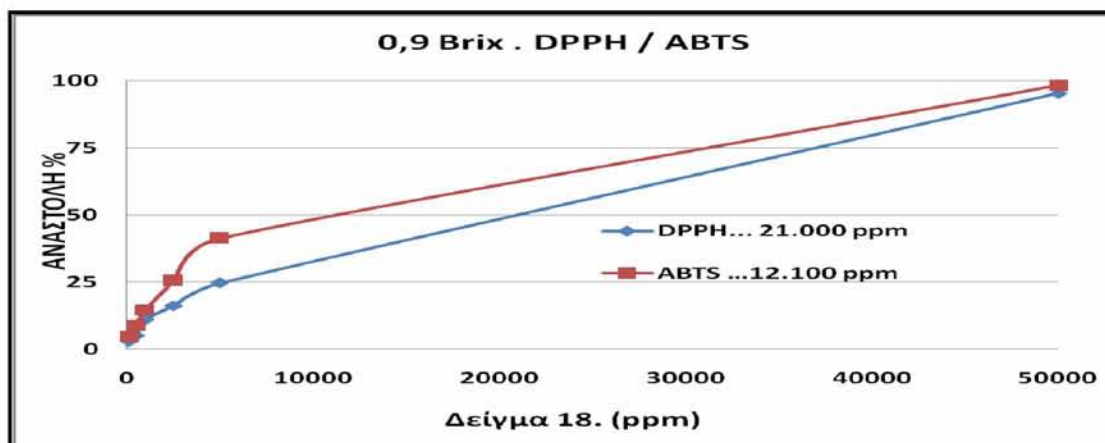
Από τα δύο (2) παραπάνω γραφήματα (7 και 8) και τον πίνακα 19, παρατηρείται ότι, με την αύξηση των στερεών στα εξεταζόμενα δείγματα, έχουμε και αύξηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 425 έως 21.000 ppm, με την μέθοδο DPPH και 220 έως 12.100 ppm με την μέθοδο ABTS. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 2 (24,1 Brix. Συμπύκνωση με Αντλία Κενού, με δύο Περάσματα). (Γράφηματα 9 και 10), ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 18 (0, 9 Brix. Στο ξέπλυμα Ρητίνης). (Γράφημα 11). Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα (9, 10, 11, 12,) που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) των ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} από τα εξετασθέντα δείγματα.



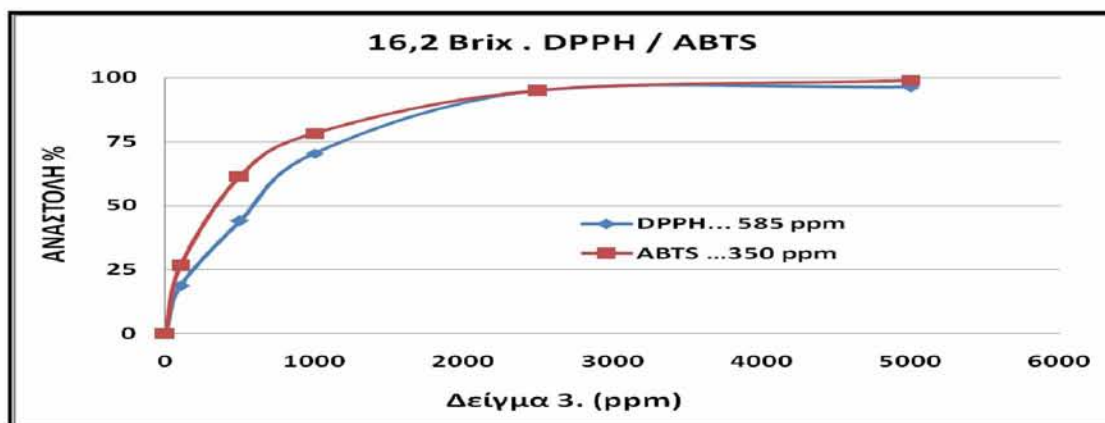
Γράφημα 9. Αναστολή % των Δειγμάτων 1 και 2 (24,1 Brix), με 1 και 2 Περάσματα, αντίστοιχα, με την μέθοδο DPPH.



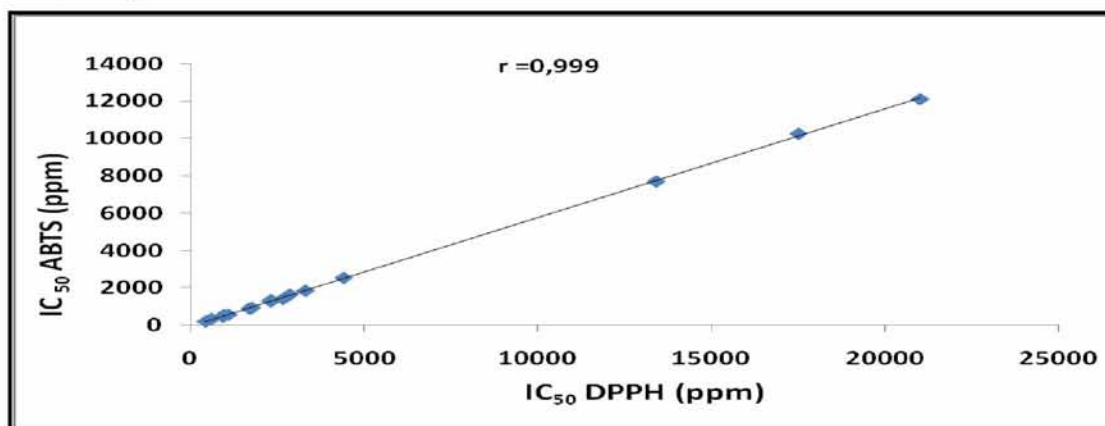
Γράφημα 10 Αναστολή % των Δειγμάτων 1 και 2 (24,1 Brix), με 1 και 2 Περάσματα, αντίστοιχα, με την μέθοδο ABTS.



Γράφημα 11. Αναστολή % του Δείγματος 18 (0,9 Brix. Στο ξέπλυμα της Ρητίνης).



Γράφημα 12. Αναστολή % του Δείγματος 3 (16,2 Brix. Μετά την Αντίστροφη Όσμωση).



Γράφημα 13. Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ των δύο μεθόδων (DPPH – ABTS).

Από το παραπάνω γράφημα, φαίνεται πως συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, είναι πάρα πολύ καλός. Αυτό σημαίνει πως ότι οι ίδιες αντιοξειδωτικές ουσίες, εξουδετερώνουν και τις δύο (2) ρίζες.

3.2. Στοιχεία Χημικής Ανάλυσης του Υγρού Αντιοξειδωτικού (24 Brix).

3.2.1. Γενικά.

Στάλθηκε δείγμα επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου και συγκεκριμένα το Νο 1 (Συμπύκνωση με Αντλία Κενού, με Ένα Πέρασμα), στο ΤΕΙ/Αθήνας, για την χημική του ανάλυση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

3.2.2. Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά.

- 1). Χρώμα: Μαύρο.
- 2). Ιξώδες: Χαμηλό.
- 3). Συνολικά Στερεά: 10% w/w. κατ' ελάχιστο ή 24 Brix.
- 4). Οσμή: Η Χαρακτηριστική Οσμή της Ελιάς.
- 5). Γεύση: Πικρή. Χαρακτηριστικό της Περιεκτικότητας σε Πολυφαινόλες.
- 6). pH = 4,5±0.1

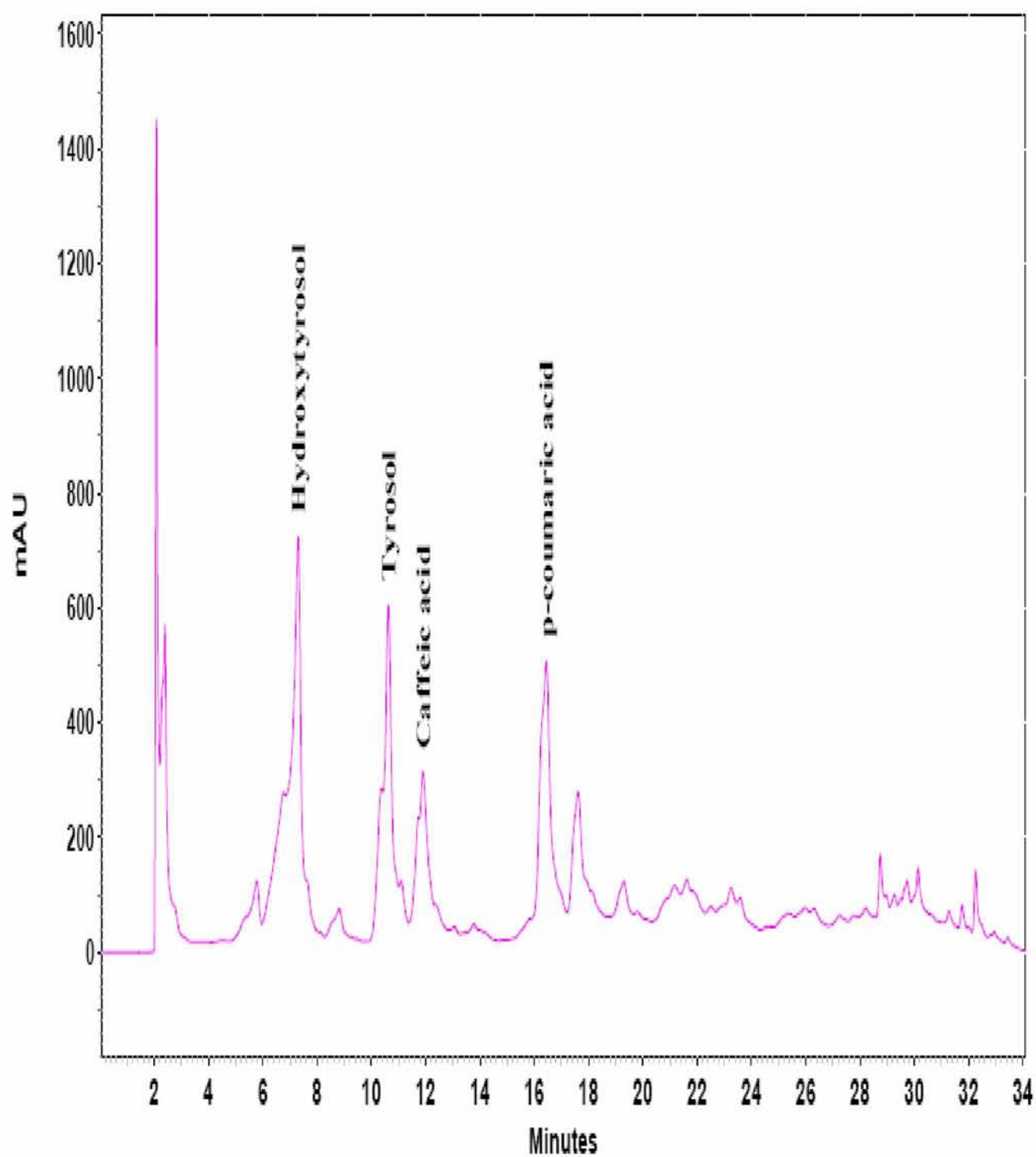
3.2.3. Χημική Σύνθεση.

- 1). Ολικό Πολυφαινολικό Περιεχόμενο.
 - α). 3.850 ppm, σε υγρή βάση.
 - β). 38.500 ppm, σε Ξηρή βάση, με την μέθοδο Folin-Ciocalteu, εκπεφρασμένο σε Γαλλικό οξύ.

3.2.4. HPLC Πολυφαινολικό Προφίλ του Προϊόντος.

Το προϊόν αναλύθηκε με την HPLC μέθοδο και περιήχε τις παρακάτω πολυφαινόλες.

	<u>ΥΓΡΗ ΒΑΣΗ</u>	<u>ΞΗΡΗ ΒΑΣΗ</u>
A) Hydroxytyrosol	500 ppm	5000 ppm
B) Tyrosol	554 ppm	5540 ppm
Γ) Caffeic Acid	20 ppm	200 ppm
Δ) p-Coumaric acid	42 ppm	420 ppm
E) Anthocyanes and catechins		



Εικόνα 24. Χρωματογραφία (HPLC) του Πολυφαινολικού Προφίλ του Προϊόντος.

3.3. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας των Επεξεργασμένων Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου με την Συσκευή Ακίδας Υπερήχων, μέσω της Αλληλεπίδρασης με τις Ρίζες DPPH[•] και ABTS^{•+}.

3.3.1. Γενικά.

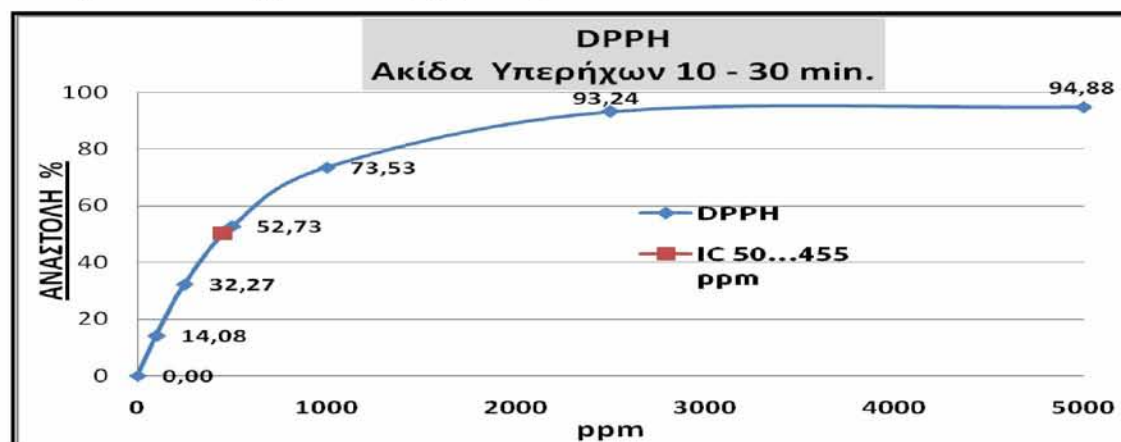
Χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, δείγμα επεξεργασμένων αποβλήτων ελαιοτριβείου (Δείγμα 1 - 24,1 Brix – IC₅₀ 780 ppm DPPH και 475 ppm ABTS). Το παραπάνω δείγμα επεξεργάστηκε και εξήχθησαν τα αποτελέσματα, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

3.3.2. Αποτελέσματα Μετρήσεων.

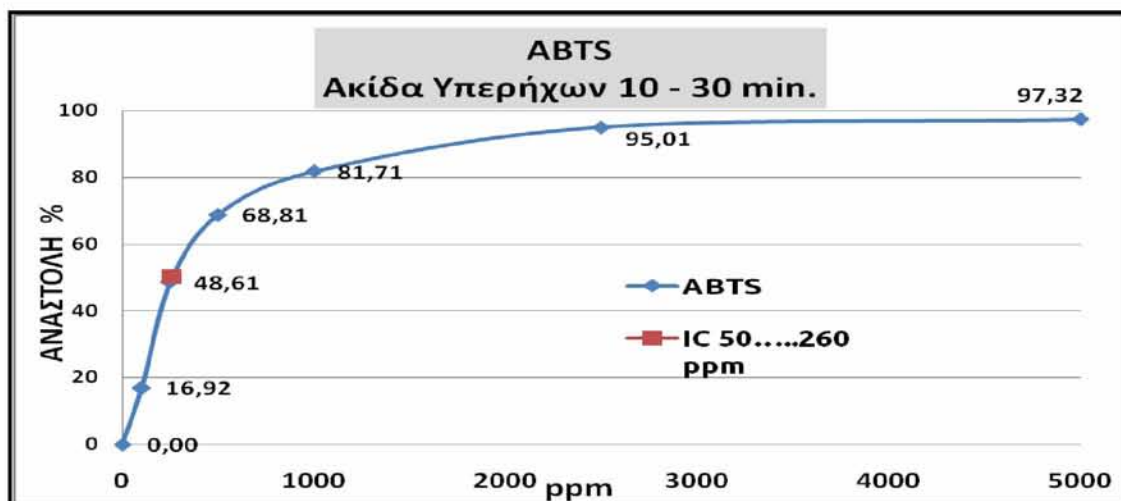
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΕ ΛΕΠΤΑ ΤΗΣ ΩΡΑΣ.	ΙΣΧΥΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΕΤΑΤΡΟΠΕΑ (WATT).					
	1		2		10	
	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS
15	540	320	575	350	470	280
30	570	340	550	330	455	260
45	585	355	570	345	500	285

Πίνακας 20. Τιμές IC₅₀ (DPPH – ABTS) του Δείγματος, μετά την Επεξεργασία με την Ακίδα Υπερήχων, με Διαφορετικές Παραμέτρους (Χρόνος Έκθεσης – Ισχύς).

Παρακάτω, στα γραφήματα 14 και 15, εμφανίζεται ή μεγαλύτερη αναστολή % των ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+}, με την συσκευή ακίδας υπερήχων σε ισχύ 10 W και χρόνο επεξεργασίας 30 min.

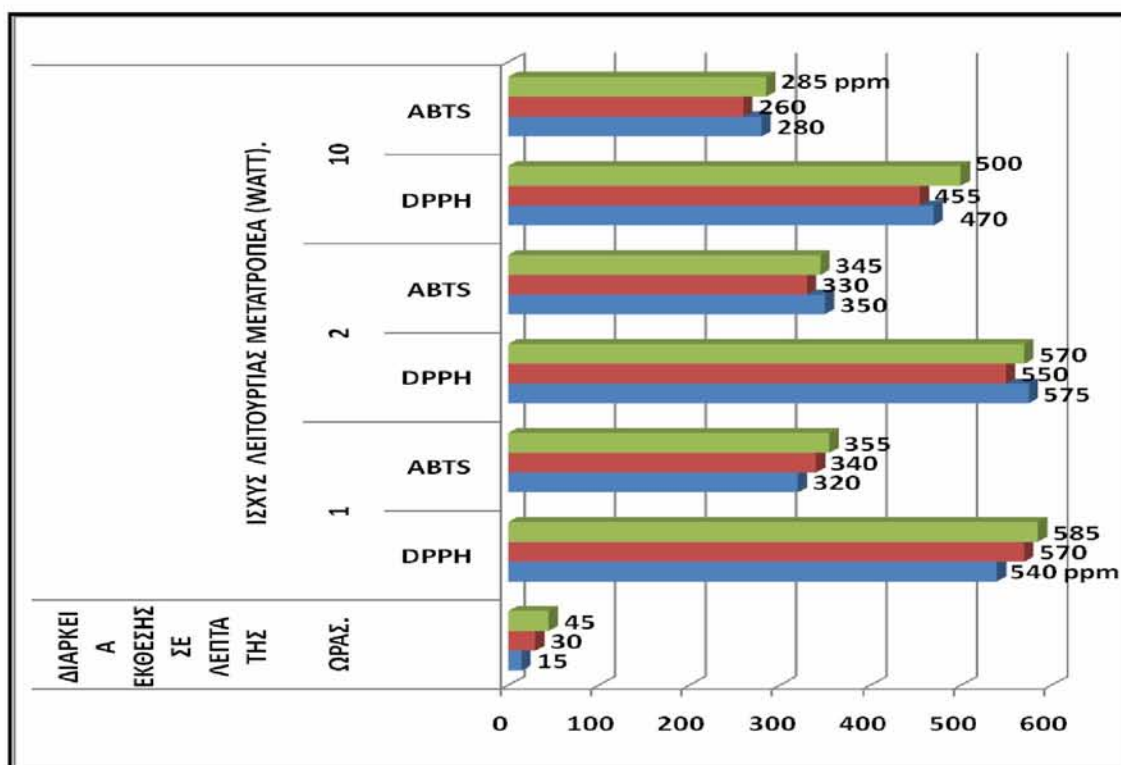


Γράφημα 14. Η % Αναστολή της ρίζας DPPH[•], από το Επεξεργασμένο Δείγμα. (30 min – Ισχύς 10 W).

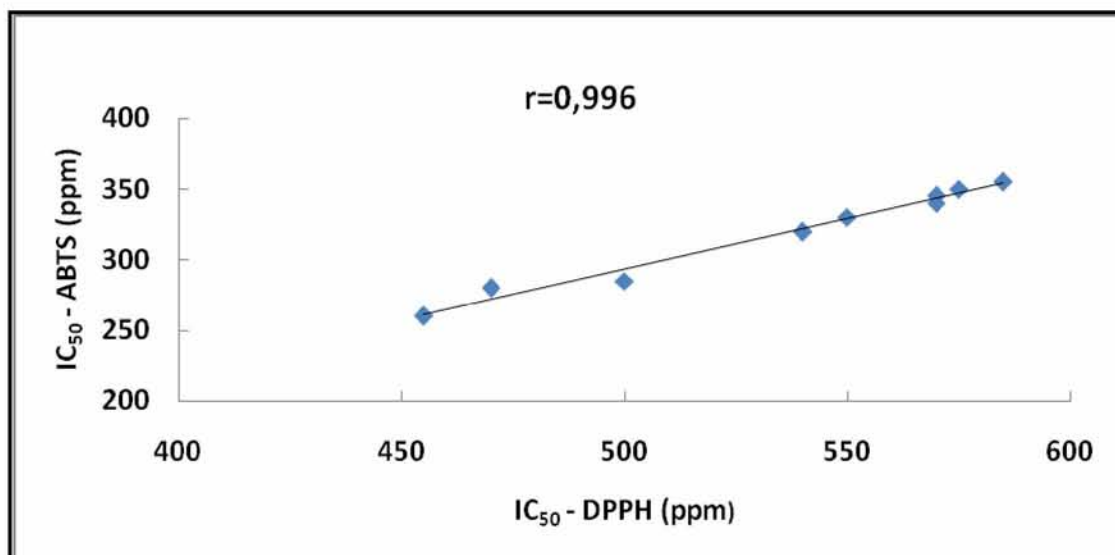


Γράφημα 15. Η % Αναστολή της ρίζας ABTS^{•+}, από το Επεξεργασμένο Δείγμα. (30 min – Ισχύς 10 W).

Όλες οι υπόλοιπες μετρήσεις έδωσαν μεγαλύτερες τιμές IC₅₀, από αυτές των δύο (2) παραπάνω γραφημάτων, αλλά όλες ήταν αρκετά μικρότερες, από το δείγμα του μάρτυρα. Παρακάτω, παρουσιάζονται σε μορφή γραφήματος, οι τιμές IC₅₀, σε όλους τους συνδυασμούς των παραμέτρων της συσκευής ακίδας υπερήχων.



Γράφημα 16. Τιμές IC₅₀ (DPPH – ABTS) του Δείγματος, μετά την Επεξεργασία με την Ακίδα Υπερήχων, με Διαφορετικές Παραμέτρους (Χρόνος Έκθεσης – Ισχύς).



Γράφημα 17. Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ των δύο μεθόδων (DPPH – ABTS), μετά την επεξεργασία στην ακίδα υπερήχων.

Στο παραπάνω γράφημα, παρατηρούμε μία σχεδόν τέλεια γραμμική συσχέτιση κατά Spearman, που σημαίνει πως οι ίδιες αντιοξειδωτικές ουσίες, συνεχίζουν και μετά την επεξεργασία με την συσκευή της ακίδας υπερήχων, να εξουδετερώνουν και τις δύο (2) ρίζες.

3.4. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας, Κατακρατήματος και Διηθήματος, που προήλθαν από τον Πειραματικό Δακτύλιο, μέσω της Αλληλεπίδρασης με τις Ρίζες DPPH• και ABTS^{•+}.

3.4.1. Γενικά.

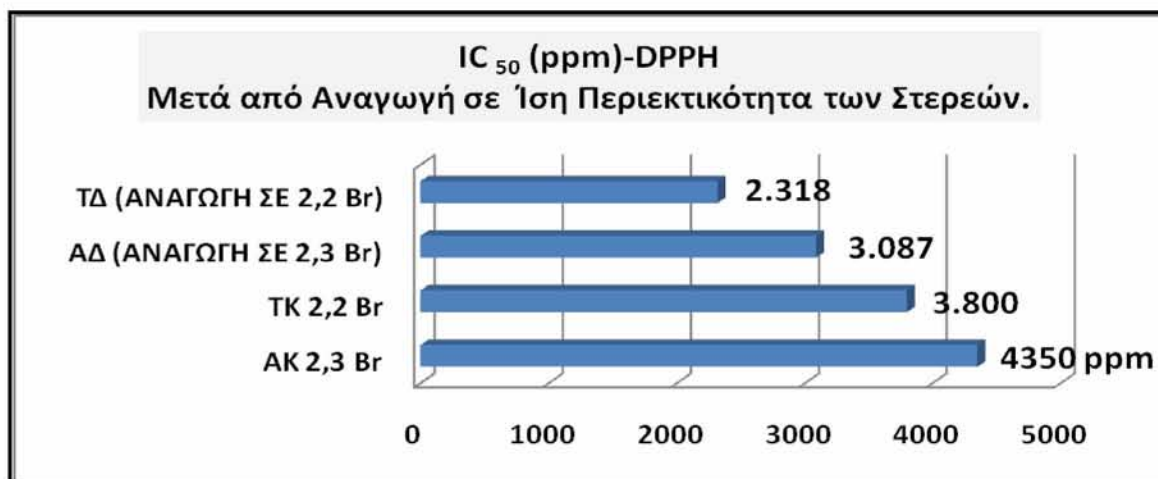
Εκτελέστηκαν μετρήσεις αντιοξειδωτικής δράσης, των δειγμάτων με τις μεθόδους DPPH και ABTS, με τα αποτελέσματα που φαίνονται στα γραφήματα (18,19 και 21).

3.4.2. Με Μεμβράνη Οξικής Κυτταρίνης (2.000 Da.)

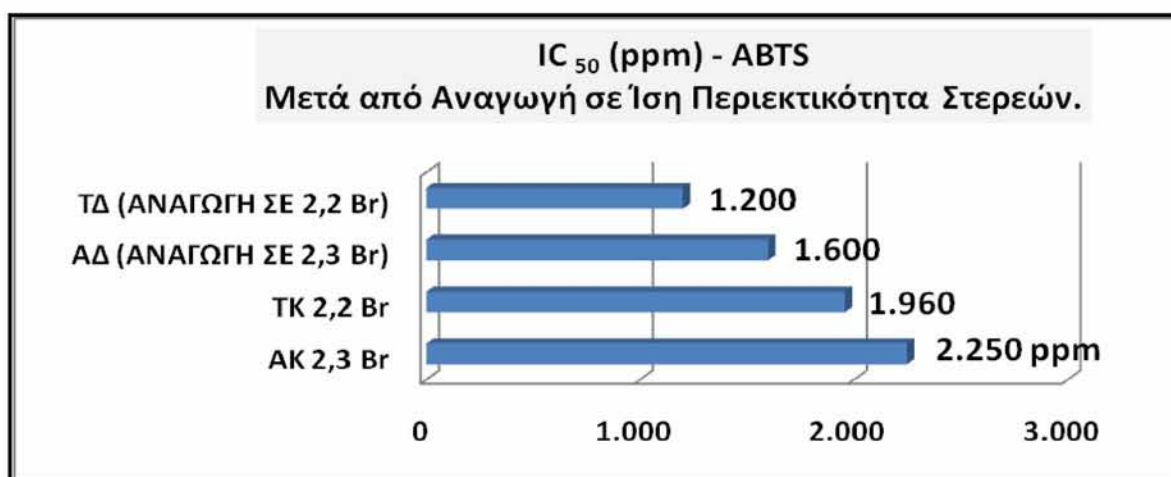
Χρησιμοποιήθηκαν επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιολιβερίου και συγκεκριμένα το δείγμα No2 -24,1 Brix, με IC₅₀ 425 ppm (DPPH) – 220 ppm (ABTS), αραιωμένο 1:10.

Ελήφθησαν τέσσερα (4) δείγματα, από την διαδικασία της υπερδιήθησης.

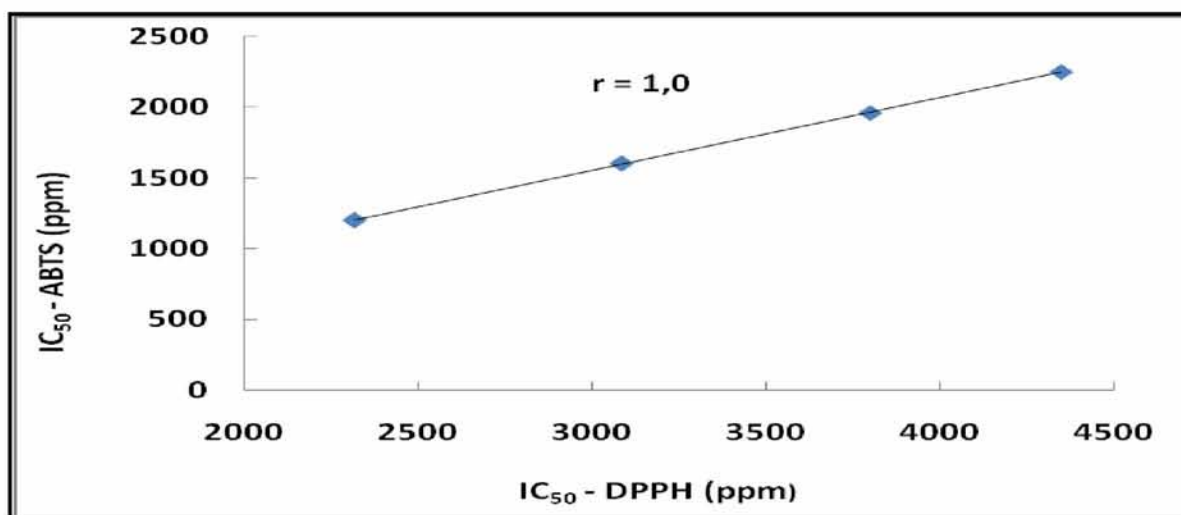
- Αρχικό Κατακράτημα. (ΑΚ). Στα 30 min.,
- Αρχικό Διήθημα. (ΑΔ). Στα 30 min.,
- Τελικό Κατακράτημα. (ΤΚ). Στις 9 ώρες και
- Τελικό Διήθημα. (ΤΔ).). Στις 9 ώρες λειτουργίας του Κυκλώματος.



Γράφημα 18. Τιμές (IC₅₀) DPPH, Κατακρατήματος – Διηθήματος (2.000 Da.)



Γράφημα 19. Τιμές (IC₅₀) ABTS, Κατακρατήματος – Διηθήματος (2.000 Da.)

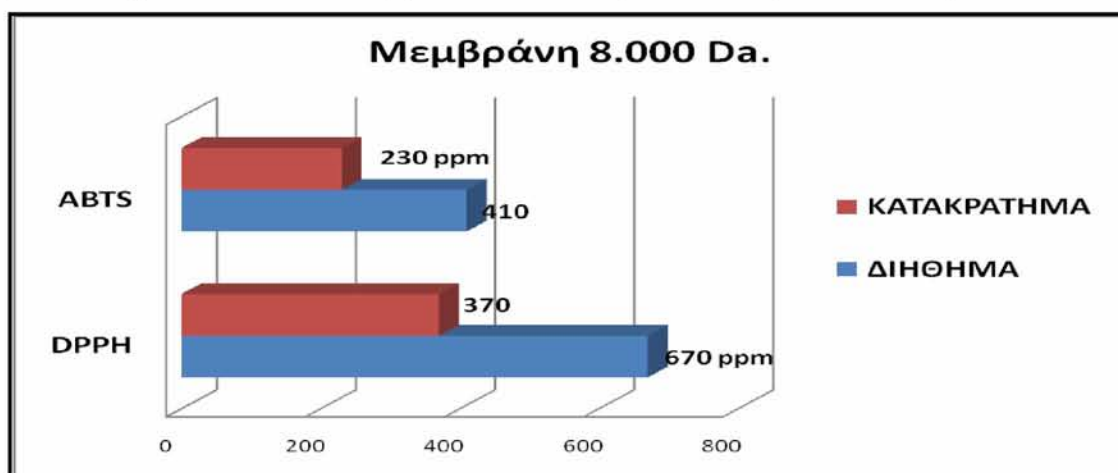


Γράφημα 20. Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ των δύο μεθόδων (DPPH – ABTS), μετά την επεξεργασία με μεμβράνη 2.000 Da.

3.4.3. Με Μεμβράνη Πολυσουλφόνης (8.000 Da.)

Χρησιμοποιήθηκαν επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιολιβερού 21,6 Brix, με IC_{50} 590 ppm (DPPH) – 335 ppm (ABTS). Δεν έγινε αραίωση, διότι δεν θα προκαλούσε πρόβλημα διήθησης.

Εκτελέστηκαν μετρήσεις αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων με τις μεθόδους DPPH και ABTS, με τα αποτελέσματα που φαίνονται παρακάτω:



Γράφημα 21. Τιμές (IC_{50}) DPPH και ABTS, Κατακρατήματος Διηθήματος (8000 Da.)

Από το παραπάνω γράφημα, παρατηρείται πως το κατακράτημα, είχε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, απ' αυτήν του διηθήματος. Ακριβώς το αντίθετο από τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν με την μεμβράνη των 2.000 Da.

3.5. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας, Ενθυλακωμένης Πολυφαινολικής Σκόνης, που Προήλθε από το Spray Dryer, μέσω της Αλληλεπίδρασης με τις Ρίζες DPPH• και ABTS^{•+}.

3.5.1. Γενικά.

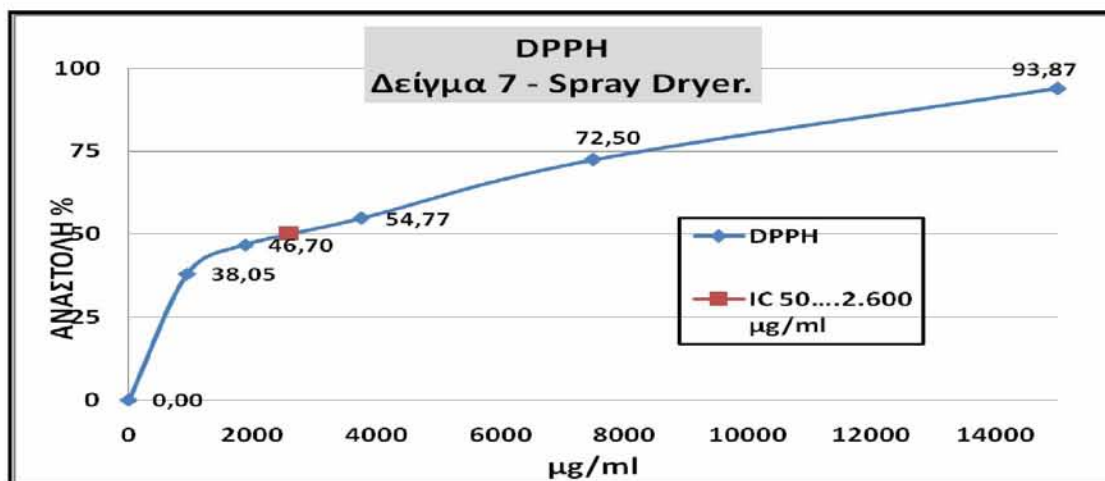
Εκτελέστηκε ενθυλάκωση των πολυφαινολών του υγρού αντιοξειδωτικού, με χρήση τεχνικών Spray Drying. Χρησιμοποιήθηκαν δεκατρία (13) διαφορετικά συστήματα ενθυλάκωσης, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 21 και σε όλα τα δείγματα έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης, μέσω της αλληλεπίδρασης, με τις ρίζες DPPH• και ABTS^{•+}.

3.5.2. Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα.

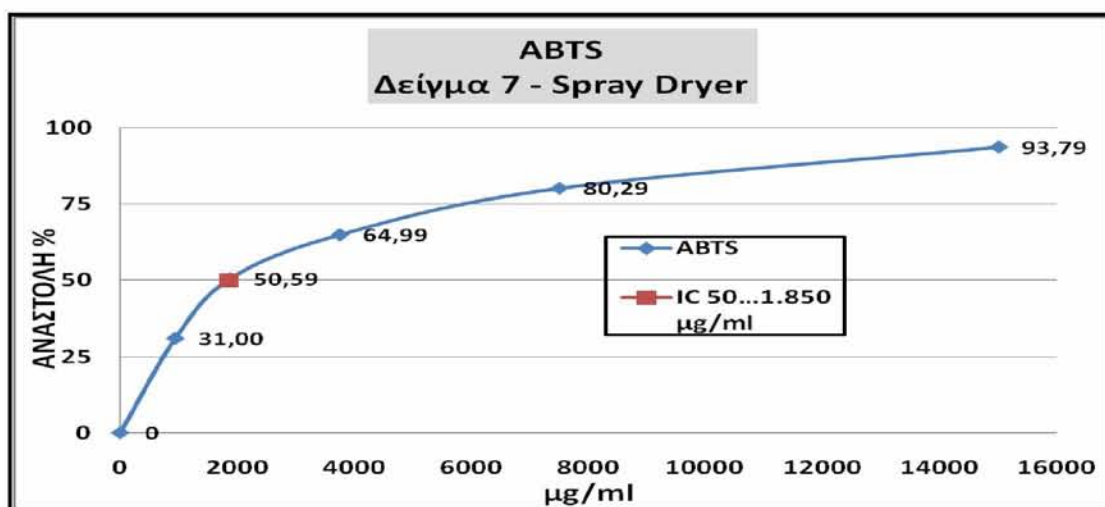
Στον πίνακα 21, παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά στοιχεία των πειραμάτων με το Spray Dryer (B-290), συμπεριλαμβανομένου και αυτά της αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC_{50}).

A/A ΔΕΙΓΜ.	ΕΙΣΟΔΟΣ ΥΓΡΟΥ.	ΕΞΟΔΟΣ ΣΚΟΝΗ (gr)	INLET (°C)	OUTLET (°C)	PUMP (%)	NOZZLE CLEANER	IC ₅₀ DPPH (μg/ml)	IC ₅₀ ABTS (μg/ml)
1	375 ml Νερό -75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	54,90	120	77	10	6	7.050	4.800
2	375 ml Νερό -75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	38,20	120	82	20	5	5.900	4.300
3	375 ml Νερό - 75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη	11,00	120	74	5	5	10.700	7.000
4	375 ml Νερό - 75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	21,90	130	76	5	5	9.350	4.650
5	375 ml Νερό -75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	13,90	160	94	5	5	6.300	4.300
6	375 ml Νερό - 75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	6,20	160	84	20	6	2.800	2.300
7	375 ml Νερό - 75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη.	20,60	100	64	5	6	2.600	1.850
8	375 ml Νερό - 75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη- 300 ml Αλκοόλης.	52,40	120	80	5	6	9.450	6.200
9	375 ml Νερό - 75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Πρωτ. Τυρογάλ.	54,40	100	69	5	6	6.100	5.500
10	370 ml Νερό - 75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνης- 5 gr. Πρωτ. Τυρογ.	43,40	120	74	5	6	6.400	5.100
11	370 ml Νερό -75 ml YAE (14,1 Br)-50 gr. Μαλτοδεξ. - 5 gr. Πρωτ. Τυρογ.- 300ml Ethanol	54,90	120	78	5	6	8.350	6.400
12	370 ml Νερό - 75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη - 5 gr. Πρωτ. Τυρογ.	33,70	100	68	5	6	10.400	6.500
13	365 ml Νερό - 75 ml YAE (14,1 Br)- 50 gr. Μαλτοδεξ. - 10 gr Ζελατίνης	54,80	120	79	5	6	6.700	4.800

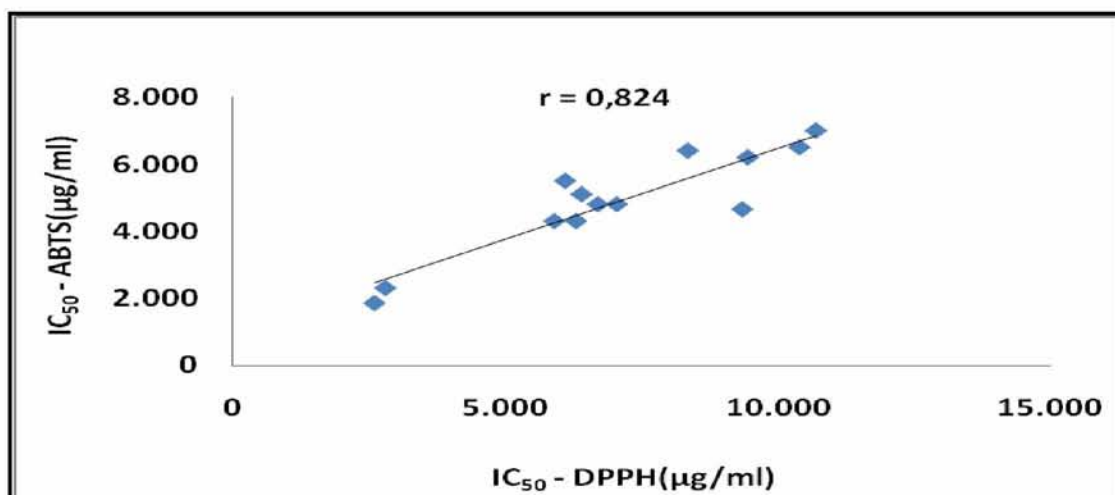
Πίνακας 21. Συγκεντρωτικά Στοιχεία Πειραμάτων με το Spray Dryer (B-290).



Γράφημα 22. % Αναστολή της Ρίζας DPPH• , από το Δείγμα 7 (Spray Dryer).



Γράφημα 23. % Αναστολή της Ρίζας ABTS^{•+}, από το Δείγμα 7 (Spray Dryer).



Γράφημα 24. Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ των δύο μεθόδων (DPPH – ABTS), μετά την επεξεργασία με Spray Dryer.

Παρατηρώντας το παραπάνω γράφημα, διαπιστώνουμε πως οι ίδιες αντιοξειδωτικές ουσίες, συνεχίζουν και μετά την επεξεργασία με την συσκευή

Spray Dryer, να εξουδετερώνουν και τις δύο (2) ρίζες, αλλά ίσως η ενθυλάκωση και η πρόσμιξη με άλλες ουσίες, να μείωσε ελαφρώς την άριστη συσχέτιση.

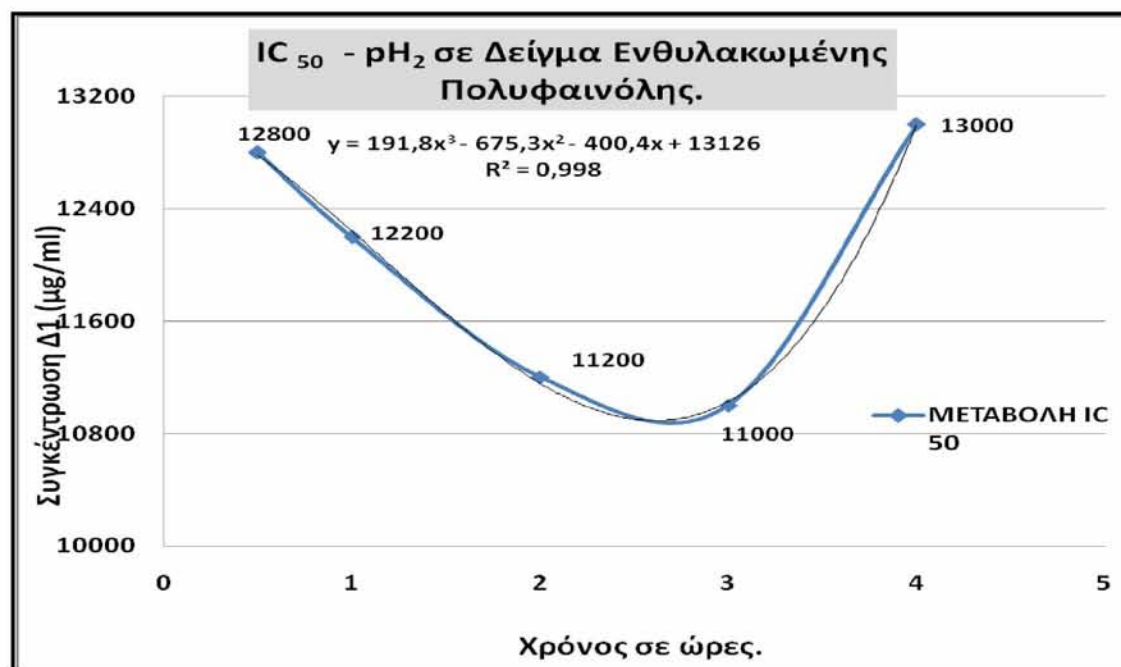
3.6. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας, Ενθυλακωμένης Σκόνης, που Προήλθε από το Spray Dryer (Δ1), μέσω της Αλληλεπίδρασης με την Ρίζα DPPH•, σε Όξινο pH.

3.6.1. Γενικά.

Εκτελέστηκε δοκιμή μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, με την μέθοδο DPPH, δείγματος από το Spray Dryer [Δείγμα 1 - Σκόνη ενθυλακωμένης πολυφαινόλης που προήλθε από, 375 ml Νερό -75 ml ΥΑΕ (14,1 Br) - 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη, με $IC_{50}=7.050\mu g/ml$.], σε όξινο pH(2), προσομειάζοντας το γαστρικό υγρό.

3.6.2. Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα.

Στον γράφημα 25, παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά στοιχεία IC_{50} των μετρήσεων του δείγματος της σκόνης, σε όξινο pH=2, σε διαφορετικούς χρόνους.



Γράφημα 25. % Αναστολή της Ρίζας DPPH•, από το Δείγμα 1 (Spray Dyer), σε Όξινο pH, σε διαφορετικούς χρόνους.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Τα τελευταία χρόνια, έχει σημειωθεί κυριολεκτικά μία έκρηξη στην παραγωγή διατροφικών προϊόντων φυτικής προέλευσης. Η αιτία είναι το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο, στο οποίο αποδίδεται βάσει μελετών, μεγάλης έκτασης βιοδραστικότητα. Είναι αξιοσημείωτο πως στην τελευταία δεκαετία, ο αριθμός των μελετών που αφορά στην βιοδραστικότητα του ελαιολάδου και των αποβλήτων της επεξεργασίας του, φθάνει πάνω από 700. Αυτό σημαίνει πως το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας είναι πολύ μεγάλο, όσον αφορά στο πολυφαινολικό προφίλ του ελαιολάδου και των αποβλήτων του, στο οποίο αποδίδονται σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες που πιθανόν να σχετίζονται με την πρόληψη ασθενειών. Κάποιες από αυτές τις ασθένειες είναι: Οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Olga Castaner 2011), ο καρκίνος (García-Villalba 2012) και οι ιώσεις (Yamada 2009).

Η παρούσα εργασία, είχε σαν σκοπό την απομόνωση – επεξεργασία πολυφαινολικών συστατικών σε μορφή υγρού εκχυλίσματος και σκόνης, υψηλής προστιθέμενης αξίας, από τα απόβλητα ελαιοτριβείου, καθώς και τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής τους δράσης, έτσι ώστε, με την κατάλληλη προσθήκη αυτών σε ποτό, τρόφιμο ή φαρμακευτικό σκεύασμα, να προσδίδονται οι θετικές ιδιότητες του ελαιολάδου.

Εκτελέστηκαν λοιπόν μέθοδοι απομόνωσης των πολυφαινολών, από το υπόλοιπο φορτίο των υγρών αποβλήτων και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των επεξεργασμένων υγρών, κατά την διάρκεια της πατενταρισμένης παραγωγικής διαδικασίας, της εταιρείας Polyhealth, που εδρεύει στην Λάρισα, στα διάφορα στάδια αυτής, με διαφορετική περιεκτικότητα σε στερεά.

Στο δείγμα No 1 (24,1 Brix, που προήλθε από το τελευταίο στάδιο επεξεργασίας – συμπύκνωση με αντλία κενού), έγινε χημική ανάλυση και έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα: Συνολικά Στερεά: 10% w/w. κατ' ελάχιστο ή 24 Brix. Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (3.850 ppm, σε υγρή βάση και 38.500 ppm, σε ξηρή βάση). Το προϊόν αναλύθηκε με την HPLC μέθοδο και περιήχε τις παρακάτω πολυφαινόλες σε υγρή βάση: Υδροξυτυροσόλη (500 ppm), Τυροσόλη (554 ppm), Καφεϊκό οξύ (20 ppm), Κουμαρικό Οξύ (42 ppm) και σε μικρότερες ποσότητες, Ανθοκυάνες και Κατεχίνες. Δεν παρατηρήθηκε στο πολυφαινολικό αυτό προφίλ η ύπαρξη της

Ελευρωπαϊκής.

Προσδιορίστηκε το IC_{50} , σε δεκαοκτώ δείγματα, που προήλθαν από τα στάδια επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση-εξουδετέρωση των ριζών (DPPH• και ABTS•⁺) που χρησιμοποιήθηκαν, κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης, σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Διαπιστώθηκε ότι κατά την διάρκεια της συμπύκνωσης, αρχικά παρατηρείται μία απότομη αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης, η οποία στη συνέχεια μετά τα 10 Brix, αυξάνει αλλά σε μικρότερο βαθμό. Εκτελέστηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων IC_{50} , των μεθόδων DPPH και ABTS, με το πρόγραμμα SPSS 18.0 και ευρέθηκε ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, ανάμεσα στις 2 αυτές μεθόδους, να έχει πάρα πολύ καλή συσχέτιση ($r=0,999$ με $p<0,01$), που σημαίνει ότι οι ίδιες αντιοξειδωτικές ουσίες, εξουδετερώνουν και τις δύο (2) ρίζες.

Επιπλέον, η παιρετέρω διήθηση, μέσω μεμβρανών μικροδιήθησης (50 και 200 nm), ενισχύει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση, σχεδόν στο διπλάσιο. (Από $IC_{50} (DPPH)=790\text{ppm}$, του πρώτου περάσματος, η τιμή του $IC_{50} (DPPH)$ στο 2ο πέρασμα = 425ppm). Το ίδιο ακριβώς αποτέλεσμα, παρατηρείται και στην περίπτωση που στο υγρό αντιοξειδωτικό, εφαρμοστεί η τεχνολογία υπερήχων (sonication). Καλύτερα αποτελέσματα παρατηρούνται με την αύξηση της ισχύος της συσκευής, παρά με τον χρόνο έκθεσης του υγρού στην συσκευή. (Από $IC_{50} (ABTS)=475\text{ ppm}$ του μάρτυρα, μετά την επεξεργασία, είχαμε $IC_{50} (ABTS)=260\text{ ppm}$). Έγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων IC_{50} , των μεθόδων DPPH και ABTS, και βρέθηκε ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, να έχει πάρα πολύ καλή συσχέτιση ($r=0,996$ με $p<0,01$), που σημαίνει ότι οι ίδιες αντιοξειδωτικές ουσίες, συνεχίζουν και μετά την επεξεργασία με την συσκευή της ακίδας υπερήχων, να εξουδετερώνουν και τις δύο (2) ρίζες.

Με χρήση μεμβράνης υπερδιήθησης οξικής κυτταρίνης 2.000 Da., διαπιστώθηκε πως το τελικό διήθημα παρουσίασε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, από ότι το κατακράτημα. Ωστόσο, στην περίπτωση χρήσης μεμβράνης υπερδιήθησης πολυσουλφόνης 8.000 Da., παρατηρήθηκε το

αντίθετο, δηλαδή το κατακράτημα είχε πολύ καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (σχεδόν την διπλάσια), σε σχέση με το διήθημα. Αυτή η αντίθεση οφείλεται στο ότι το πέρασμα των μορίων από τις μεμβράνες εξαρτάται όχι μόνο από το M.B., αλλά και από τη διαμόρφωσή τους και κατά συνέπεια, διαφορετικά μόρια περνάνε από τις δύο μεμβράνες. Επίσης, μπορεί να οφείλεται και στο ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά αρχικά δείγματα στις δύο μεμβράνες. Είναι ένα θέμα που απαιτεί περαιτέρω έρευνα.

Ακολουθώντας, έγινε ενθυλάκωση των πολυφαινολών των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, με χρήση τεχνικών Spray Drying και Freeze Drying και διαπιστώθηκε ότι τα καλύτερα και άμεσα αποτελέσματα, ήταν αυτά που προέκυψαν με την χρήση του Spray Drying. Χρησιμοποιήθηκαν δεκατρία (13) διαφορετικά συστήματα ενθυλάκωσης. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά περίπτωση για την ενθυλάκωση, εκτός του επεξεργασμένου υγρού, που προήλθε από το στάδιο της αντίστροφης όσμωσης (14,1 Brix), ήταν: μαλτοδεξτρίνη, πρωτεΐνη τυρογάλακτος και ζελατίνη. Στο δείγμα No7, παρατηρήθηκαν οι μικρότερες τιμές IC_{50} των δύο (2) ριζών, δηλαδή η ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Πλην όμως, από τα 500 ml του διαλύματος (375 ml Νερό - 75 ml επεξεργασμένα ΥΑΕ- 50 gr. Μαλτοδεξτρίνη), ελήφθησαν 20,6 gr σκόνης. Το περισσότερο όμως τελικό προϊόν, περί τα 55 gr., παρατηρήθηκε στα συστήματα ενθυλάκωσης με α/α: 1, 9, 11 και 13. Διαπιστώθηκε ότι το καλύτερο είναι το δείγμα με α/α 9 του τελικού προϊόντος, με την χρήση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος (μη αλλεργικός παράγοντας). Τα υπόλοιπα τρία τελικά προϊόντα να μεν έχουν το ίδιο βάρος, αλλά παρουσιάζουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και επιπλέον το προϊόν με α/α 11 που περιέχει την ζελατίνη, ίσως να προκαλεί αλλεργίες.

Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης των τιμών IC_{50} των δύο μεθόδων (DPPH – ABTS), μετά την επεξεργασία με Spray Dryer, όλων των δειγμάτων έδωσε $r=0,824$ και $p<0,01$ που σημαίνει ότι να μεν οι ίδιες αντιοξειδωτικές ουσίες, συνεχίζουν και μετά την επεξεργασία με την συσκευή Spray Dryer, να εξουδετερώνουν και τις δύο (2) ρίζες, αλλά ίσως η ενθυλάκωση και η πρόσμιξη με άλλες ουσίες, να μείωσε ελαφρώς την άριστη συσχέτιση.

Επίσης, έγινε μία δοκιμή μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, δείγματος από το Spray Dryer (σκόνη ενθυλακωμένης πολυφαινόλης, σε μαλτοδεξτρίνη), σε όξινο pH, προσομοιάζοντας το ανθρώπινο στομάχι, όπου εκτελείται η πέψη μακρομορίων. Διαπιστώθηκε ότι στις συνθήκες χαμηλού pH(2), η ενθυλακωμένη πολυφαινόλη ναι μεν παρουσιάζει αντιοξειδωτική δύναμη, αλλά αυτή είναι χαμηλότερη απ'ότι σε ουδέτερο. Η τιμή του IC₅₀ σε ουδέτερο pH ήταν 7.050 µg/ml. Μετά από μισή ώρα σε όξινο pH (2), η τιμή του IC₅₀ αυξήθηκε στα 12.800 µg/ml, που σημαίνει ότι υπήρξε κάποια ελάττωση της αντιοξειδωτικής δράσης. Στη συνέχεια μετά από 3 ώρες σε όξινο pH παρατηρήθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης (IC₅₀ στα 11.000 µg/ml) λόγω πιθανώς της απελευθέρωσης πολυφαινολικών μορίων από το καψύλιο ενθυλάκωσης. Ωστόσο, μετά από 4 ώρες σε όξινο pH παρατηρήθηκε αύξηση του IC₅₀ στα 13.000 µg/ml, ίσως λόγω επίδρασης του όξινου pH στη δράση των πολυφαινολικών μορίων. Το συμπέρασμα πάντως είναι ότι σε όξινο pH τα ενθυλακωμένα πολυφαινολικά μόρια διατηρούν για μεγάλο χρονικό διάστημα την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Έτσι, πιστοποιείται η αντοχή του καψυλίου και η δυνατότητα απορρόφησης αυτού περαιτέρω στο έντερο, δίδοντας έτσι επιπρόσθετα οφέλη. Μία πρόταση είναι η εξέταση του δείγματος, σε συνθήκες pH εντέρου (4-5), όπου συνεχίζεται η πέψη και η απορρόφηση των διαφόρων θρεπτικών στοιχείων.

Από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, για την απομόνωση – επεξεργασία πολυφαινολικών συστατικών σε μορφή υγρού εκχυλίσματος και σκόνης, υψηλής προστιθέμενης αξίας, από τα απόβλητα ελαιοτριβείου, καθώς και ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής τους δράσης, είναι θετικά και ενθαρρυντικά. Το υγρό αντιοξειδωτικό, αλλά και η ενθυλάκωση αυτού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την βιομηχανία, για ενίσχυση – βελτίωση προϊόντων διατροφής και φαρμακευτικών σκευασμάτων, έτσι ώστε, με την κατάλληλη προσθήκη αυτών σε ποτό, τρόφιμο ή φαρμακευτικό σκεύασμα, να προσδίδονται οι θετικές ιδιότητες του ελαιολάδου.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afanas'ev, I.B. "Oxygen radicals in biological processes (survey)". 1985. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 19 (1) , pp. 1-11.
- Andrikopoulos, N.K., Kalogeropoulos, N., Falirea, A., Barbagianni, M.N. "Performance of virgin olive oil and vegetable shortening during domestic deep-frying and pan-frying of potatoes". 2002. *International Journal of Food Science and Technology* 37 (2) , pp. 177-190.
- Baydar, N. G., Ozkan, G., & Sagdic, O. "Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.)". 2004. *Food Chemistry*, 15, 335–339.
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Eccella N, Saija A. "On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol". 1999. *J. Pharm. Pharmacol* Aug; 51(8):971-4.
- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longoc, L., Rescioa, L. "An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. 2008. *Separation and Purification Technology*, 64, 192–197.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", 1995. *Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Brenes, M., Garcia, P., Duran, M.C., Garrido, A., "Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olive". 1993. *J. Food Sci.* 58, 347–350.
- Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M., & Velic, D. "Study of solid– liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds". 2007. *Journal of Food Engineering*, 81, 236–242.
- Capasso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis MA, Cristinzio G. "Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters." 1995. *J. Appl. Bacteriol* Oct; 79(4): 393-8.
- Caruso D, Berra B, Giavarini F, Cortesi N, Fedeli E, Galli G. "Effect of virgin olive oil phenolic compounds on in vitro oxidation of human low density lipoproteins". 1999. *Nutr Metab Cardiovasc. Dis.* Jun;9(3):102-107.

- Castañer, O., Fitó, M., López-Sabater, M.C., Poulsen, H.E., Nyyssönen, K., Schröder, H., Salonen, J.T., Covas, M.I. "The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial". 2011. *Clinical Nutrition* 30 (4), pp. 490-493.
- Castapeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernandez, Ma, Elena, Ma, Paez Hernandez, J. A., Rodriguez Galan-Vidal, J. A., & Galan-Vidal. "Chemical studies of anthocyanins: A review". 2009. *Food Chemistry*, 113, 859–871.
- Cicerale, S., Lucas L., Russell, K. "Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil". 2010. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, pp. 458-479.
- Corrales, M., Fernandez Garcva, A., Butz, P., & Tauscher, B. "Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure". 2009. *Journal of Food Engineering*, 90, 415–421.
- De La Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, Martin-Romero M, Smith-Agreda JM, de la Cuesta FS. "Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol" 2000. *Thromb Res* Nov. 15; 100(4):305-15.
- De la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR. "Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil" 1999. *Biochem. Pharmacol* Feb 15; 57(4):445-9.
- Dell'Agli, M., Maschi, M, O., Galli, G, V., Fagnani, R., Dal Cero, E., Caruso, D., Bosisio, E. "Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. 2008. *British Journal of Nutrition*. Volume 99, pp 945 – 951.
- Dew T., Day A., Morgan M. "Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components". 2005. *Department of Food Science, University of Leeds*.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk. "Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress". 2004. *Progr. Lipid Res*, 43: 200 -227.
- Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, de la Torre C,

- Marrugat J. "Olive oil and inhibition of low density lipoprotein oxidation. Role of phenolic compounds". 2000. *Med Clin (Barc)* Jul 1; 115(5): 166-9.
- Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, Torrents L, Marrugat J. "Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation". 2000. *Lipids* Jun; 35(6): 633-8.
 - García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraro, C., Menéndez, J.A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. "Uptake and metabolism of olive oil polyphenols in human breast cancer cells using nano-liquid chromatography coupled to electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry". 2012. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 898, pp. 69-77.
 - Gerschman R., Gilbert D.L., Nye S.W., Dwyer P. and Fenn W.O. "Oxygen poisoning and x-irradiation: A mechanism in common". 1954. *Science Magazine*.
 - Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., Janssens, J., Johnston, B., Rondanelli, M. "Cancer prevention in Europe: The mediterranean diet as a protective choice". 2012. *European Journal of Cancer Prevention*. Article in Press.
 - Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS. "Chemoprevention". 1995. *CA Cancer J Clin*, 45: 31-49.
 - Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview". 1990. *Methods in Enzymology* 186, pp.1-85.
 - Haslam, E., Cai, Y. "Plant polyphenols (vegetable tannins): Gallic acid metabolism". 1994. *Natural Product Reports* 11 (1), pp. 41-66.
 - Hevonoja, T., Pentikäinen, M.O., Hyvönen, M.T., Kovanen, P.T., Ala-Korpela, M. "Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL". 2000. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1488 (3), pp. 189-210.

- Hey, T., Jönsson, K., La Cour Jansen, J. "Full-scale in-line hydrolysis and simulation for potential energy and resource savings in activated sludge - A case study". 2012. *Environmental Technology* (United Kingdom) 33 (15) , pp. 1819-1825.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. "A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruit and vegetables". 2011. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- Israilides, C., Vlyssides, A.G. "Characterization of wastewaters from a polyesteric and or cellulosic fibres dyeing and finishing process". 1997 *Fresenius Environmental Bulletin* 6 (11-12) , pp. 705-710 .
- Jennings Thomas A., "Lyophilization: Introduction and Basic Principles". 1999. Phase Technologies, Pennsylvania, USA.
- Jurd L, King AD Jr, Mihara K, Stanley WL. "Antimicrobial properties of natural phenols and related compounds". 1971. *Appl Microbiol Mar*; 21(3):507-10.
- Karin, M., Greten, F.R. "NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression". 2005. *Nature Reviews Immunology* 5 (10) , pp. 749-759.
- Kaur C, Kapoor HC, "Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables". 2002. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(2), 153–161.
- Kerbel, R.S., Man, M.S., Dexter, D. "A model of human cancer metastasis: Extensive spontaneous and artificial metastasis of a human pigmented melanoma and derived variant sublines in nude mice". 1984. *Journal of the National Cancer Institute* 72 (1), pp. 93-108.
- Kohyama N, Nagata T, Fujimoto S, Sekiya K. "Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol, a phenolic compound from olives". 1997. *Biosci Biotechnol Biochem. Feb*; 61(2):347-50.
- Komilis, D.P., Karatzas, E., Halvadakis, C.P. "The effect of olive mill wastewater on seed germination after various pretreatment techniques". 2005. *Journal of Environmental Management* 74 (4) , pp.

339-348.

- Lemmer, H. "Biological additives in waste water treatment". 1997. *European Water Pollution Control* 7 (3) , pp. 2-3.
- Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J.-C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J., Labat, M. "Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems". 2001. *Food Chemistry* 75 (4) , pp. 501-507.
- Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. "The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells". 1997. *J. Nutr.* 127:286–292.
- Manna, C., Napoli, D., Cacciapuoti, G., Porcelli, M., Zappia, V. "Olive Oil Phenolic Compounds Inhibit Homocysteine - Induced Endothelial Cell Adhesion Regardless of Their Different Antioxidant Activity". 2009. *Agric. Food Chem.*, 57, 3478-3842.
- Medina E, Brenes M, García A, Romero C, de Castro A. "Bactericidal activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products" 2009 *Food Prot. Dec*; 72(12):2611-4.
- Mekki, A., Dhouib, A., Sayadi, S. "Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters". 2007. *Journal of Environmental Management* 84 (2) , pp. 134-140.
- Merken, H. M., & Beecher, G. R. "Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review". 2000. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577–599.
- Molyneux P. "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity". 2004. *J. Sci. Technol.*, 26(2): 211-219.
- Nahar, L., & Sarker, S. D. "Supercritical fluid extraction" 2005. *Natural Products Isolation*, 20, 47–76.
- Niaounakis, M., Halvadakis C.P., "Olive Processing Waste Management". 2006. *Literature Review and Patent Survey, Second Edition*, Elsevier

- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. "The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil". 2000. *European Journal of Cancer* 36 (10) , pp. 1235-1247.
- Paiva-Martins F., Fernandez, J., Rocha, S., Nascimento, E., Vitorino, R. "Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage". 2009. *Mol. Nut. Food Res.*, 53. 609-616.
- Palenzuela, B., Arce, L., Macho, A., Munoz, E., Rios, A., & Valcarcel, M. "Bioguided extraction of polyphenols from grape marc by using an alternative supercritical-fluid extraction method based on a liquid solvent trap". 2004. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 2021–2027.
- Palma, M., & Taylor, L. T. "Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide". 1999. *Journal of Chromatography A*, 849, 117–124.
- Paraskeva, C.A., Papadakis, V.G., Kanellopoulou, D.G., Koutsoukos, P.G., Angelopoulos, K.C. "Membrane filtration of olive mill wastewater and exploitation of its fractions". 2007. *Water Environment Research* 79 (4) , pp. 421-429.
- Paster N, Juven BJ, Harshemesh H. "Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents". 1988. *J. Appl Bacteriol.* Apr; 64(4): 293-7.
- Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. "Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil" 1995. *Thromb Res* Apr 15;78(2):151.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M. J., & Nicoli, M. C. "Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts". 2005. *Food Chemistry*, 92, 109–117.
- Prior R, Xianli W, Schaich K, "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements". 2005. *J. Agric. Food Chem.* 53 (6) : 1841-1856.

- Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. "Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid". 1996. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No. 7:933-956.
- Rosen, G.M., Pou, S., Cohen, M.S., Hassett, D.J., Britigan, B.E., Barber, M.J., Cao, G.-L., Halpern, H.J. "14N-Spin trapping of free radicals in the presence of 15N-spin labeled *Neisseria gonorrhoeae*". 1999. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2* (2), pp. 297-300.
- Rozzi, A., Malpei, F. "Treatment and Disposal of Olive Mill Effluents". 1996. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38 (3-4) , pp. 135-144.
- Ryan, D., Robards, K. "Phenolic compounds in olives". 1998. *Analyst* 123 (5) , pp. 31R-44R.
- Scoditti, E., Calabriso, N., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Martines, G., De Caterina, R., Carluccio, M.A. "Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer". 2012. *Archives of Biochemistry and Biophysic*.
- Scoditti, E., Calabriso, N., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Martines, G., De Caterina, R., Carluccio, M.A. "Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer". 2012. *Archives of Biochemistry and Biophysics Article in Press*.
- Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aligiannis N, Angelis A, Komiotis D, Skaltsounis AL, Kouretas D. "Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts". 2008. *Agric Food Chem*. Aug 27; 56(16):6967-76.
- Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D "Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative

- stress regulation.” *In Vivo*. 2011 Jul-Aug;25(4):657-62.
- Spanou CI, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Aligiannis N, Angelis A, Skaltsounis AL, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Kouretas D. J “Effects of Greek legume plant extracts on xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase activities.” *Physiol Biochem*. 2012 Mar; 68(1):37-45.
 - Speroni E, Guerra MC, Minghetti A, Crespi-Perellino N, Pasini P, Piazza F, Roda A. “Oleuropein evaluated in vitro and in vivo as an antioxidant”. 1998. *Phytother Res*; 12:S98–S100.
 - Srinandan, C.S., Shah, M., Patel, B., Nerurkar, A.S. “Assessment of denitrifying bacterial composition in activated sludge”. 2011. *Bioresource Technology* 102 (20) , pp. 9481-9489.
 - Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, Magiatis P, Kouretas D. J “Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes” *Agric Food Chem*. 2007 Jun 27;55(13):5246-52.
 - Syed Harris Omar. “Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive”. 2010. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18, 111-121.
 - Trosko, J.E., Chang, C.C. “Stem cell theory of carcinogenesis”. 1989. *Toxicology Letters* 49 (2-3) , pp. 283-295.
 - Trosko, J.E., Chang, C.C., Medcalf, A. “Mechanisms of tumor promotion: Potential role of intercellular communication”. 1983. *Cancer Investigation* 1 (6) , pp. 511-526.
 - Tsimidou, M., Papadopoulos, G., Boskou, D. “Phenolic compounds and stability of virgin olive oil”. 1992 *Food Chemistry* 45 (2) , pp. 141-144.
 - Vaya, J., Aviram M. “Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications”. 2001. *Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, Volume 1, pp. 99-117(19).
 - Visioli F, Borsani L, Galli C. “Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals” 2000. *Cardiovasc. Res*. Aug 18; 47(3):419-25.

- Visioli F, Galli C. "Antitheroanogenic Components of Olive Oil." 2001. *Atherosclerosis* 157(1):64-67.
- Visioli, F., Galli, C. "Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health". 1998. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (10), pp. 4292-4296.
- Vlyssides, A.G., Bouranis, D.L., Loizidou, M., Karvouni, G. "Study of a demonstration plant for the co-composting of olive-oil-processing wastewater and solid residue". 1996. *Bioresource Technology* 56 (2-3) , pp. 187-193.
- Walter WM Jr, Fleming HP, Etchells JL. "Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives" 1973. *Appl. Microbiol.* Nov; 26(5): 773-6.
- Watanabe, K., Hamada, T., Thankachan, T.S., Mayan Kutty, P.C. "Studies on the vaporization mechanisms of organic pollutants in an evaporator". 1995. *Desalination* 103 (3) , pp. 177-187.
- Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia VB, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. "Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus". 2009. *Antiviral Res.* Jul; 83(1):35-44.
- Zaharaki D., Komnitsas K., Manousaki K. "Assessment of reactivity of sulphidic tailings and river sludges". 2009. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis* 9 (4), pp. 313-318.